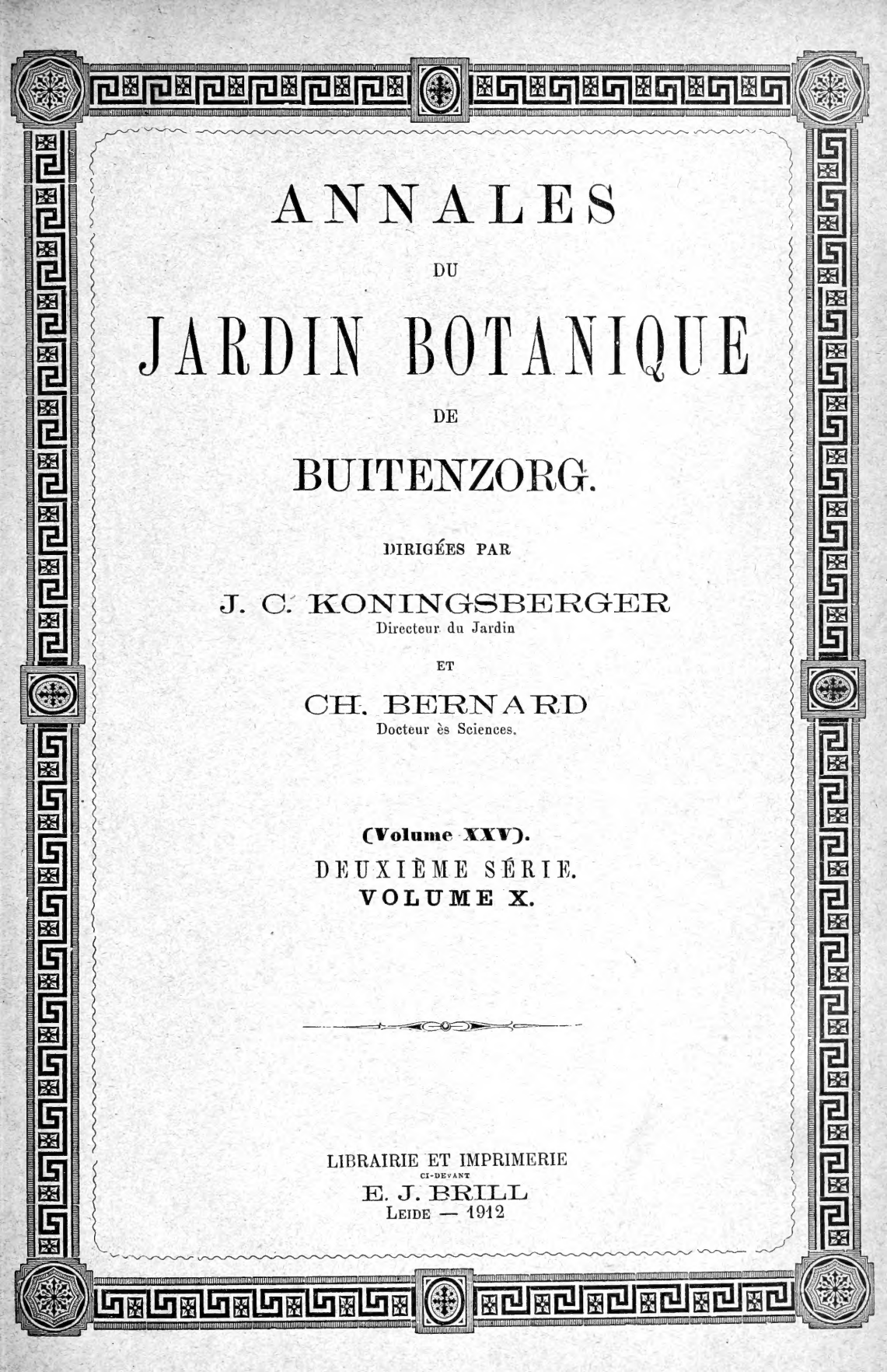


LIBRARY OF THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN





ANNALES
DU
JARDIN BOTANIQUE
DE
BUITENZORG.

DIRIGÉES PAR

J. C. KONINGSBERGER

Directeur du Jardin

ET

CH. BERNARD

Docteur ès Sciences.

(Volume XXV).

DEUXIÈME SÉRIE.

VOLUME X.

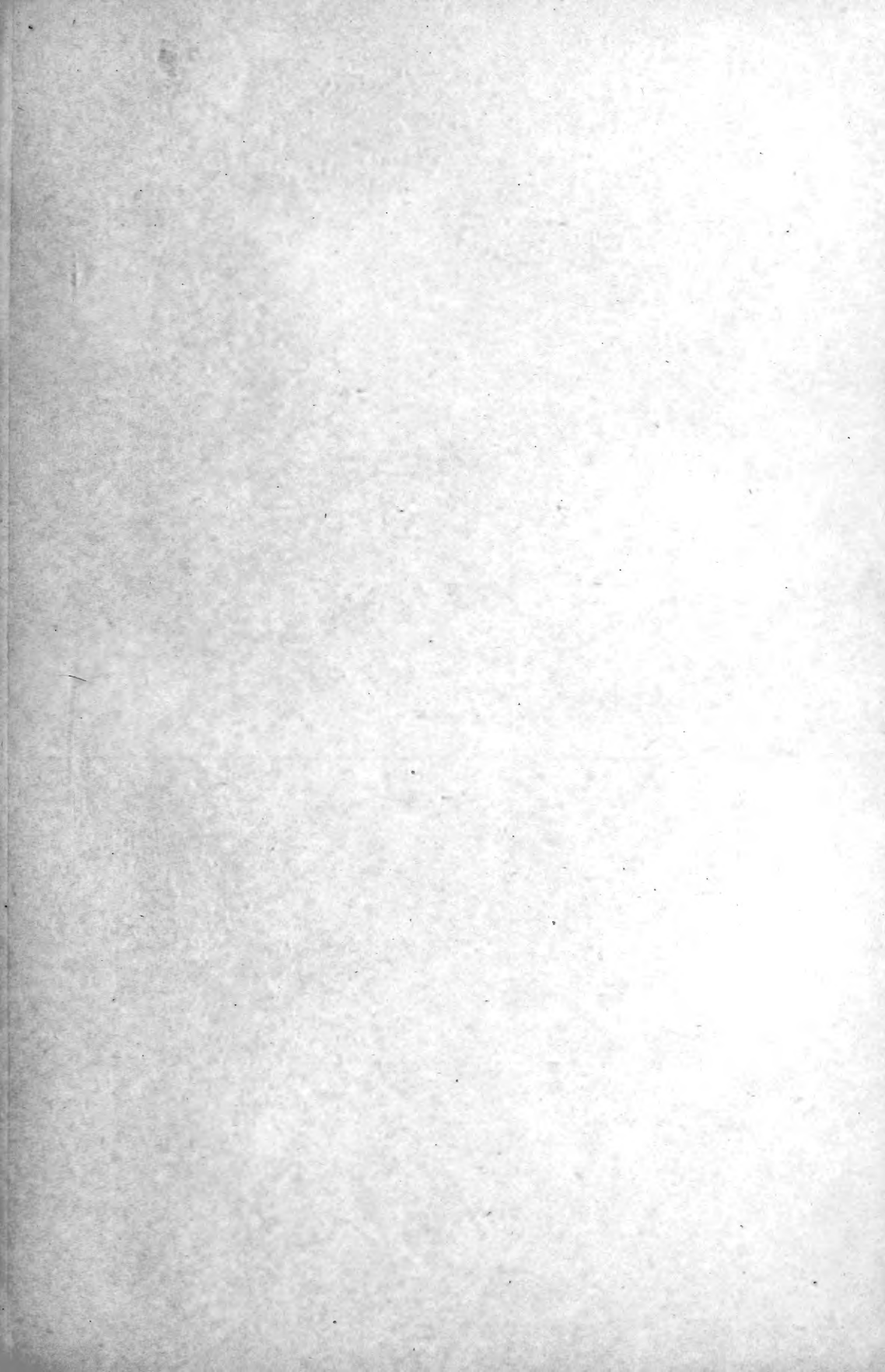
LIBRAIRIE ET IMPRIMERIE

CI-DEVANT

E. J. BRILL

LEIDE — 1912





ANNALES
DU
JARDIN BOTANIQUE DE BUITENZORG.

(Volume XXV.)
DEUXIÈME SÉRIE.
VOLUME X.

A N N A L E S
DU
JARDIN BOTANIQUE
DE
BUITENZORG.

DIRIGÉES PAR

J. C. KONINGSBERGER
Directeur du Jardin

ET

CH. BERNARD
Docteur ès Sciences.

(Volume XXV.)

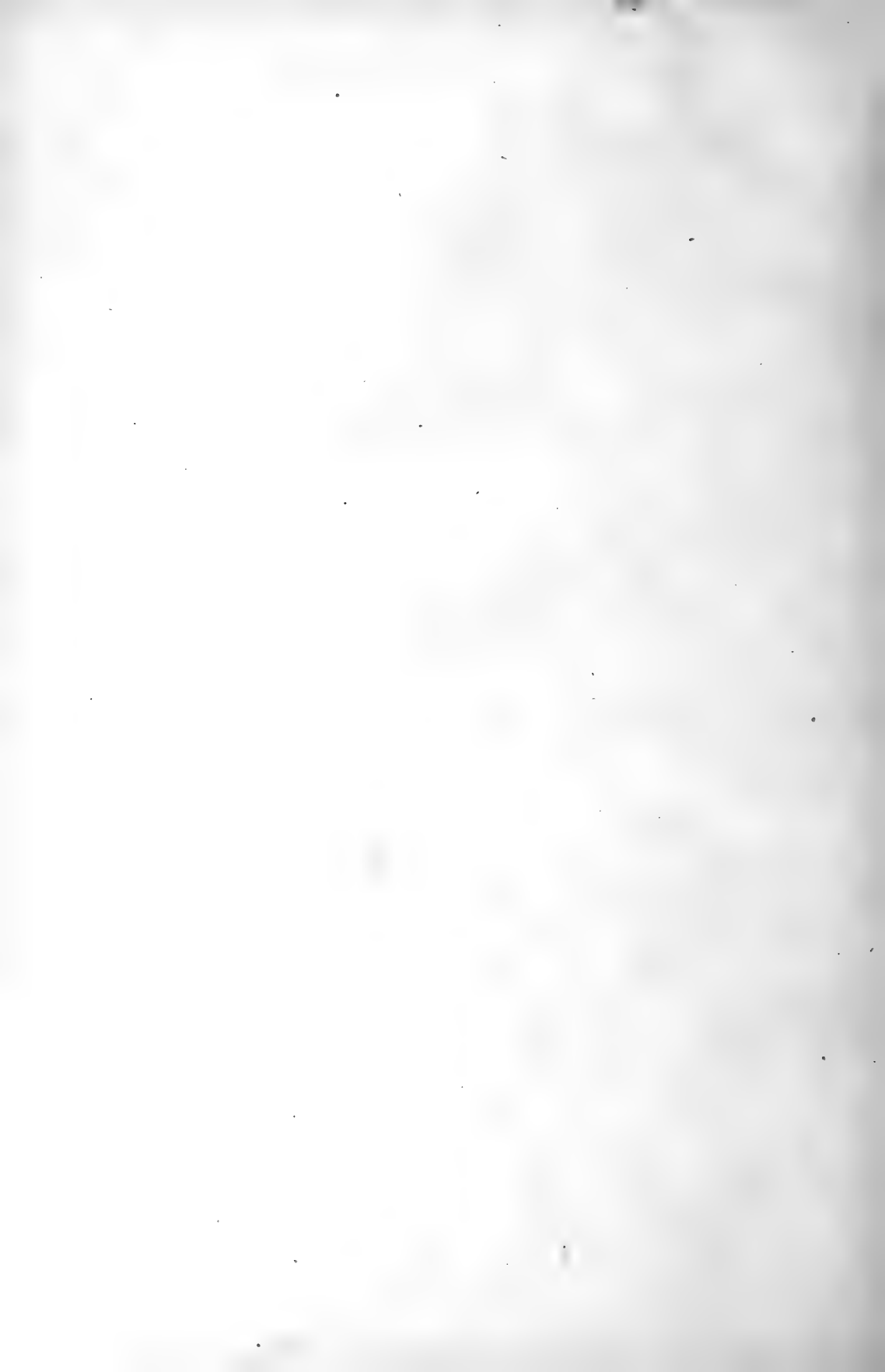
DEUXIÈME SÉRIE.
VOLUME X.


LIBRAIRIE ET IMPRIMERIE
CI-DEVANT
E. J. BRILL
LEIDE — 1912.

.N 5613
V. 25

TABLE DES MATIÈRES.

	Pag.
BERNARD (Ch.) et H. L. WELTER, A propos des ferments oxydants	1
A. Discussion des méthodes utilisées pour mettre en évidence les ferments oxydants.	4
B. Essais concernant plus spécialement les ferments oxydants du thé.	20
FABER (Dr. F. C. von), Morphologisch-Physiologische untersuchungen an Blüten von Coffea-arten	59
Figurenerklärungen zu Tafel I—XII.	157
ERNST (A.) und CH. BERNARD, Beiträge zur Kenntnis der Saprophyten Javas	161
IX. Entwicklungsgeschichte des Embryosackes und des Embryos von <i>Burmannia candida</i> Engl. und <i>B. Championii</i> Thw.	161
Figurenerklärungen zu Tafel XIII—XVII	185
LEHMANN (ERNST), Veronica Javanica Blume, ein Ubiquist Tropischer und Subtropischer Gebirge	189
DOCTERS VAN LEEUWEN (W.), Ueber die vegetative vermehrung von <i>Angiopteris Evecta</i> Hoffm	202
Figurenerklärnng zu Tafel XVIII	209





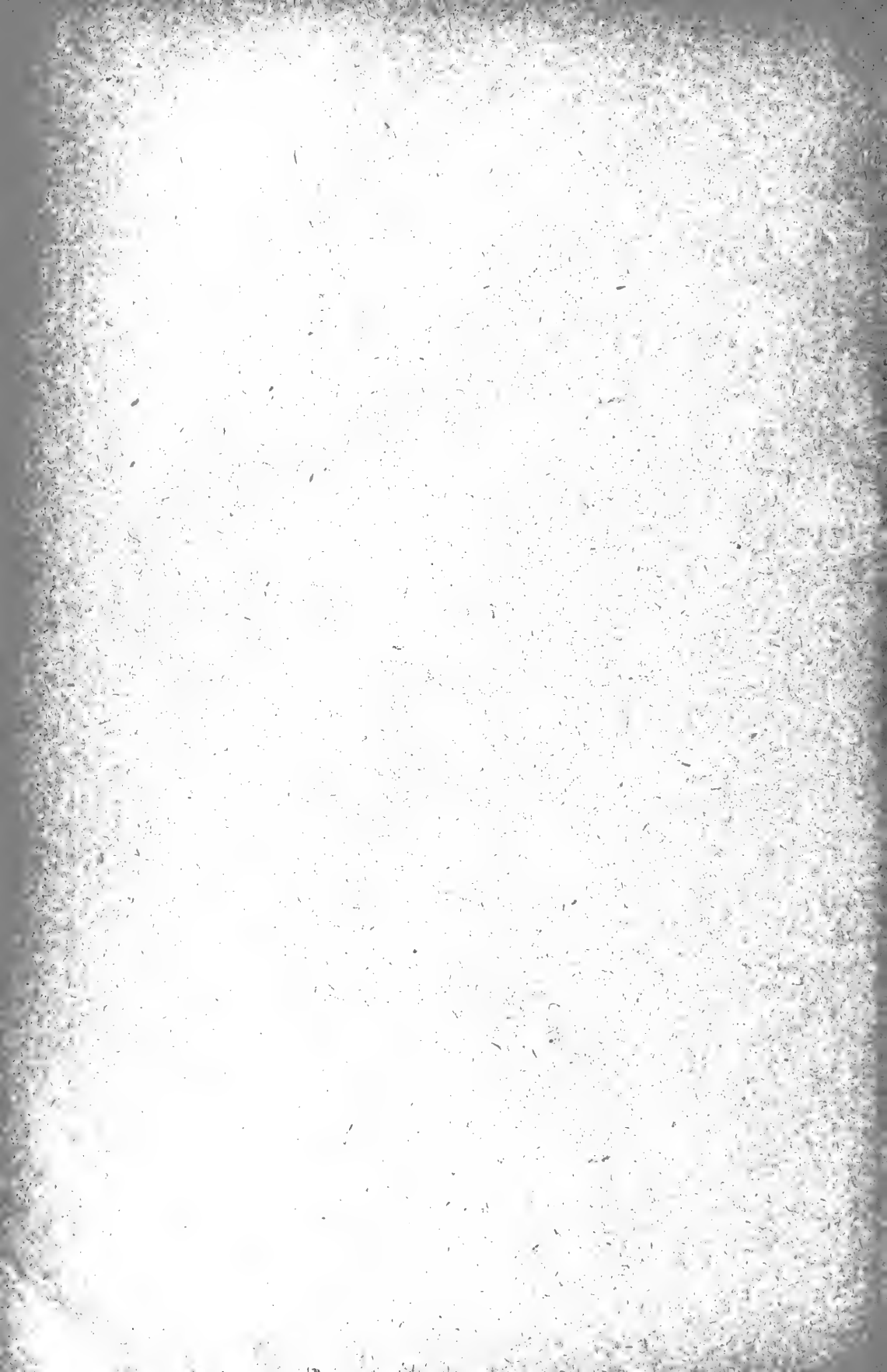
ANNALES
DU
JARDIN BOTANIQUE
DE
BUITENZORG.

DIRIGÉES PAR
J. C. KONINGSBERGER
Directeur du Jardin

ET
CH. BERNARD
Docteur ès Sciences.

(Volume XXV).
DEUXIÈME SÉRIE.
VOLUME X.
1^o PARTIE.

LIBRAIRIE ET IMPRIMERIE
CI-DESSUS
E. J. BRILL
LEIDE — 1912



A PROPOS DES FERMENTS OXYDANTS,

PAR

CH. BERNARD ET H. L. WELTER

Dr. ès Sciences,

Technologue.

A. Discussion des méthodes utilisées pour mettre en évidence les ferments oxydants.

I. INTRODUCTION.

Nous avons depuis quelque temps entrepris des recherches sur la fermentation du thé, et nous avons publié sur cette question une première note ¹⁾ que nous comptons faire suivre d'une série de publications où nous donnerons au fur et à mesure le résultat de nos investigations, avec l'espoir qu'elles contribueront à apporter quelque lumière dans ce problème si mal connu.

En effet, quand on parcourt les travaux publiés jusqu'ici à ce sujet, on se rend compte que la plupart des théories ne sont que des hypothèses basées sur des faits plus ou moins exactement observés, que toutes les discussions portent sur des points encore bien obscurs, enfin que presque toutes les conclusions sont basées sur les résultats d'expériences rarement établies de façon méthodique.

Nous avons déjà résumé dans notre précédente publication les deux courants qui se dessinent actuellement pour expliquer la fermentation du thé, à savoir: cette fermentation est basée sur une oxydation qui ne serait pas due uniquement à l'action spontanée de l'oxygène de l'air, mais s'effectuerait sous l'influence de ferments solubles existant soit dans la feuille, disent

1) Bernard. Sur la présence de levures dans le thé en fermentation. (Bull. du Dép. Agric. aux Indes-Néerl. N^o. XXXVI, 1910).

les uns, soit, prétendent les autres, dans des levures qui se développeraient au cours des diverses phases de la préparation. Bamber, Mann, van Romburgh, Nanninga,¹⁾ et d'autres sont les promoteurs de l'idée que les éléments actifs de la fermentation du thé sont des enzymes existant dans la feuille même; Bosscha²⁾ voudrait que les levures jouassent un rôle prépondérant, et cette opinion a donné lieu, dans les colonnes de l'„Indische Mercur", à une polémique entre cet auteur et Nanninga³⁾.

Dans notre précédente publication, nous nous sommes efforcé de ne pas tomber dans ce travers de schématiser un peu trop, et d'établir des conclusions prématurées dans cette question compliquée où tout est encore presque inconnu; nous étions arrivé à la conclusion que, en effet, des arguments parlent soit en faveur d'une action des ferments de la feuille, soit en faveur d'une action de microorganismes; nous avons essayé d'exposer impartialement ces arguments, tout en admettant que, très probablement, la fermentation du thé n'est pas due exclusivement à l'une ou à l'autre de ces actions, mais au contraire que les ferments de la feuille, tout comme les ferments sécrétés par des levures, jouent peut-être un rôle dans le phénomène; ces divers éléments agiraient sans doute sur les diverses substances qui se trouvent dans la feuille pour les faire fermenter et donner ainsi au thé préparé ses caractères complexes. Nous

1) Bamber. Report on Ceylon soils and their effects on the quality of Tea, (Colombo, 1900).

Mann. The enzymes of the tea leaf (Journ. Asiatic Soc. of Bengal, 1901). — The ferment of the tea leaf. I. II. III. (Calcutta, 1902, 1903, 1904).

v. Romburgh en Lohmann. Verslagen over de onderzoekingen betreffende de op Java gecultiveerde theeën (Nos. 1—6).

Nanninga. Verslagen over de onderzoekingen betreffende de op Java gecultiveerde theeën (Nos. 7 et suivants). — Onderzoekingen omtrent de theefabrikatie (Teysmannia 1901).

2) Bosscha. — Het ferment van de thee, (Notulen Soek. Landb. Ver., Sept. 1909). — Nogmaals Theefermentatie, (Indische Mercur, 1910, N^o. 36, P. 719). — Theefermentatie, (Ind. Mercur, 1910, N^o. 41, P. 814).

3) Nanninga. — Compte rendu du travail de Bernard: „Sur la présence de levures..." (Ind. Mercur 1910, N^o. 34, P. 680). — Antwoord aan Dr. J. Bosscha in zake Theefermentation, (Ind. Mercur, 1910, N^o. 39, P. 775).

ajoutions qu'il était nécessaire de reprendre toute la question dès le début, car malgré leur valeur, les expériences étaient trop peu nombreuses et portaient sur un trop petit nombre de cas pour que leurs résultats puissent être acceptés tels quels, sans contrôle; dans ce but, nous avons entrepris toute une série d'essais qui sont exposés ici, et qui, nous l'espérons pourront être poursuivis sur une plus vaste échelle.

Il nous était nécessaire tout d'abord de revoir, dans la littérature concernant les ferments oxydants, toutes les méthodes, toutes les théories susceptibles de trouver quelque application dans le cas spécial qui nous intéressait. Nous nous proposons entre autres d'étudier à fond le ou les ferments constatés dans la feuille de thé par divers auteurs, et notamment l'oxydase à laquelle Newton ¹⁾ a donné le nom de *théase*; il était urgent de déterminer ces ferments dans les différents organes de la plante, dans les diverses conditions où elle se trouve, puis de les extraire pour étudier éventuellement leur action. Puis nous voulions faire de même avec les levures que nous avons réussi à mettre en culture, voir leur action sur la feuille de thé, étudier si possible les ferments solubles excrétés par ces micro-organismes, etc.

Tel était le programme que nous nous étions fixé; mais, dès le début, nous fûmes arrêtés par des difficultés de méthode qui nous obligèrent à reprendre tout le côté technique de la question, de façon à mettre en évidence les diverses causes d'erreurs qui peuvent se présenter et à discuter les diverses méthodes appliquées; nous pensons être utiles à ceux qui pourraient travailler dans la même direction que nous, sur les mêmes plantes et dans les mêmes conditions, en publiant ici les quelques observations que nous avons faites; nous les mettrons ainsi en garde contre des faits qui pourraient venir fausser leurs résultats, et nous espérons les préserver de tâtonnements qui, pour nous, étaient inévitables.

Cette introduction nous était d'autant plus nécessaire qu'on

1) — Newton. Oxydising enzymes (Indian Gardening, 1901). — The fermentation of the tea leaf (Indian Gard. 1901).

pourrait nous reprocher dans la suite de nos travaux de n'avoir pas utilisé certaines méthodes en usage en enzymologie; nous devons donc commencer par cette discussion technique afin de faire comprendre pourquoi il nous a semblé préférable de laisser de côté, pour la plante qui dans la suite nous occupera plus spécialement et dans les conditions où nous travaillons, des méthodes qui, ailleurs, pour d'autres plantes, pouvaient être appliquées et avaient donné des résultats satisfaisants; il ressort du reste des traités généraux sur les enzymes, que les méthodes sont mal connues et qu'elles méritent d'être étudiées dans chaque cas particulier. Il va sans dire que notre exposé n'a pas la prétention d'être complet; nous n'avons pas à notre disposition toute la littérature du sujet, et peut-être, dans la discussion des méthodes ou dans leur application, négligeons-nous des détails importants ou signalons-nous des faits déjà connus; nous nous en excusons d'avance, et nous espérons que notre manque de ressources bibliographiques n'aura pas d'influence sur nos conclusions.

II. MÉTHODE.

a. *Réactifs.*

Nous ne portons notre attention, pour l'instant, que sur les ferments oxydants connus sous les noms d'*oxydases* et de *peroxydases*; nous aurons à discuter ci-dessous la valeur de ces termes, la nature de ces substances, leur mode d'action et les rapports qui peuvent exister entre elles. Nous laissons temporairement de côté les *catalases*, quitte à y revenir dans des recherches ultérieures, s'il nous paraît nécessaire de définir le rôle qu'elles jouent dans la feuille de thé, la part qu'elles peuvent prendre à sa fermentation; on sait, du reste, que la catalase n'est plus considérée comme un véritable ferment oxydant.

Comme réactifs, nous devons donc tenir compte de ceux permettant de mettre en évidence ces oxydases et peroxydases, et en première ligne de l'émulsion de gaïac, que des expériences préliminaires nous avaient démontrée favorable à nos études;

nous devons essayer également la solution d'iodure de potassium et d'amidon qu'on trouve souvent préconisée dans la littérature, et que nous discuterons plus loin. Incidemment, nous avons étudié l'action de ces ferments sur d'autres substances facilement oxydables, et nous en parlerons à l'occasion.

La solution alcoolique de résine de gaïac donne dans l'eau une émulsion d'un blanc laiteux contenant de fines particules d'acide gaïaconique, substance oxydable en bleu de gaïac; l'émulsion oxydée prend alors une belle couleur bleue¹⁾. Cette oxydation ne se fait à l'air que très lentement, mais elle se fait directement et plus ou moins rapidement si, au liquide, on ajoute un peu d'une des substances connues sous le nom d'oxydases.

Un peu d'eau oxygénée étant ajoutée à l'émulsion de gaïac, celle-ci ne s'oxyde que lentement; mais en présence d'un des ferments connus sous le nom de peroxydases, les particules d'acide gaïaconique s'oxydent en bleu de gaïac. La réaction se fait plus ou moins rapidement, selon des conditions que nous aurons à discuter. Quant aux proportions de substances à utiliser, il n'est pas besoin de les exposer longuement; l'opérateur acquerra bien vite le tour de main nécessaire à obtenir de bonnes émulsions. Disons par exemple que si, à 10 cm³ d'eau²⁾ on ajoute 1 cm³ d'une solution alcoolique à 2% de résine de gaïac³⁾, on aura une émulsion très propre à la réaction. Quant à l'eau oxygénée, nous avons dans une burette une solution contenant 5 cm³ d'eau oxygénée concentrée (30%) plus 100 cm³ d'eau distillée. Nous parlerons plus loin des effets de la concentration de l'eau oxygénée sur la réaction.

1) La solution alcoolique de gaïac peut aussi donner directement la réaction, mais l'émulsion, d'un blanc laiteux, est d'un emploi plus commode, le bleuissement étant plus distinct.

2) Il est à peine besoin d'insister sur la nécessité de travailler toujours avec de l'eau distillée, et même distillée dans des conditions spéciales de pureté; nous verrons en effet que des traces de sels de fer, de cuivre, de plomb, des traces d'alcalis, peuvent influencer la réaction.

3) Nous reviendrons sur le fait qu'il est nécessaire d'employer des solutions alcooliques de gaïac fraîchement préparées.

Rappelons brièvement les théories qui sont généralement admises pour expliquer l'action des deux groupes de ferments qui nous intéressent.

Les peroxydases auraient le pouvoir de décomposer l'eau oxygénée ($H_2 O_2$) ou d'autres peroxydes caractérisés par le groupe $\overset{0}{\underset{0}{\text{---}}}$ en mettant en liberté de l'oxygène atomique, donc actif, qui oxyderait l'acide gaïaconique ou d'autres substances oxydables. (Il faut se souvenir que les catalases décomposent $H_2 O_2$ en mettant en liberté de l'oxygène moléculaire, incapable de provoquer ces oxydations). Les „oxydases” ne seraient en somme pas différentes des peroxydases dans leur action: on admet qu'elles peuvent oxyder directement la gaïac sans qu'il soit nécessaire de leur adjoindre un peroxyde ($H_2 O_2$ par exemple); mais il faut se souvenir que, d'après la théorie de Bach et Chodat ¹⁾, les oxydases ne seraient pas des ferments simples, mais une combinaison de deux ferments: une peroxydase (peroxydase- β) et une „oxygénase”, cette dernière étant un *peroxyde organique* du même groupe $X \overset{0}{\underset{0}{\text{---}}}$; donc, dans la réaction de l'oxydase, il s'agirait encore de l'action de cette peroxydase- β sur un peroxyde organique (l'oxygénase) qui céderait de l'O actif. Nous reviendrons à plusieurs reprises pour les discuter sur ces théories; il suffisait ici d'en indiquer le principe.

b. *Influence de substances pulvérulentes sur la réaction.*

Comme nous avons à notre disposition d'abondantes cultures de la levure blanche-laitieuse dont nous avons parlé dans notre précédente note ²⁾, il nous semblait intéressant d'en extraire si possible des ferments oxydants; nous pensions obtenir les meilleurs résultats en broyant fortement les masses de cellules de levures avec du sable fin, jusqu'à en obtenir une pâte homogène qu'on diluerait dans de l'eau, pour y faire agir ensuite

1) Chodat et Bach. Untersuchungen über die Rolle der Peroxyden in der Chemie der lebenden Zellen. (Diverses publications dans les Berichte der deutschen chem. Gesellschaft, 1902—1904). — Recherches sur les ferments oxydants (Arch. des Sc. Phys. et Natur., Genève, 1904). — Etc.

2) Bernard. Sur la présence de levures, etc.

les réactifs des oxydases et peroxydases. On sait que plusieurs auteurs ont pu, après avoir broyé des cellules de levures avec du sable, obtenir un extrait aqueux où des ferments étaient en solution.

Nous avons pu faire, à propos de cette méthode, quelques observations qui nous semblent dignes d'être relevées, car nous n'avons pas pu les trouver citées dans la littérature.

Quand nous avons dilué la pâte obtenue comme il est indiqué ci-dessus dans de l'eau et que nous avons ajouté du gaïac et un peu d'eau oxygénée, nous apercevions bientôt que l'émulsion prenait une teinte bleue assez vive et qui allait s'accroissant peu à peu; nous pensions au premier abord être en présence d'une réaction provoquée par une peroxydase existant dans les cellules de nos levures; mais si, en effet, comme nous le verrons, nos levures peuvent excréter de la peroxydase, elles possèdent ce ferment en quantités très petites et qui ne concordent nullement à la forte réaction indiquée ci-dessus; en laissant reposer le liquide où nous avons fait la réaction, et en recommençant l'expérience sans agiter les tubes, nous pûmes alors nous rendre compte que la coloration se faisait à partir de la base du verre, là où s'était formé un dépôt constitué par le sable et par les levures. Nous pouvions nous demander si peut-être, dans le fait d'employer du sable, ne résidait pas une cause d'erreur et nous avons répété l'expérience en broyant du sable seul, et non plus avec des levures; nous nous convainquîmes alors que, dans ces conditions, la réaction se produisait tout aussi bien; le sable ¹⁾ provoquait, en présence de H_2O_2 , l'oxydation de l'acide gaïaconique en bleu de gaïac, il agissait sur l'eau oxygénée à la façon des ferments connus sous le nom de peroxydases. L'expérience fut répétée à maintes reprises et donna toujours les mêmes résultats: la coloration bleue du gaïac était plus forte si la quantité du sable était plus considérable, ou bien s'il avait été plus finement broyé; la réaction provenait bien du sable et non d'une autre substance qui

1) Nous avons travaillé avec le sable fin dit „Seesand mit Säure gereinigt” de Merck.

aurait pu exister dans l'émulsion, car en observant le dépôt du sable au fond du tube, on le voyait rapidement prendre une teinte bleue qui se répandait dans le liquide à la moindre agitation; si le sable avait été bien pulvérisé, de façon que l'eau en soit devenue trouble, la réaction se manifestait dans toute la masse de l'émulsion.

Malgré que cette supposition fût bien improbable, nous avons pensé que notre sable pouvait contenir des impuretés, peut-être des substances vivantes, ou tout au moins des matières organiques qui viendraient fausser nos observations; mais tel n'était pas le cas; nous avons utilisé le sable soit après l'avoir chauffé au rouge sur une plaque métallique, soit après l'avoir fait bouillir pendant plusieurs heures, et les résultats obtenus furent toujours les mêmes. On pourrait supposer que de petites quantités de combinaisons de fer, manganèse ou autres métaux, existant peut-être dans le sable, pourraient éventuellement participer à la réaction; mais des essais nous ont montré que les réactions obtenues avec des traces de ces métaux, ne semblent pas correspondre à celles obtenues avec le sable.

L'expérience fut reprise avec des solutions de pyrogallol ou d'hydroquinone, auxquelles nous avons ajouté un peu de H_2O_2 et qui, sous l'action du sable, s'oxydaient bien plus vite et bien plus fortement que dans les flacons témoins, dépourvus de sable.

Divers essais nous ont démontré que ce sont bien les très fines particules de sable, restées en suspension dans le liquide à la façon des substances colloïdales, qui provoquent la réaction; entre autres ce fait que le liquide trouble, chargé de particules de sable, ne pouvait plus, après avoir été clarifié par filtration au filtre Pasteur, activer le bleuissement du gâïac. L'activité de ces particules serait due à leur énorme surface, d'autant plus considérable qu'elles sont plus ténues; leur action est donc catalytique, c'est à dire que, par leur présence, elles sont capables de provoquer ou d'activer une réaction; comme sur tant d'autres phénomènes catalytiques, la température a une grande influence sur cette réaction du sable. Pour le démontrer, nous avons fait un certain nombre d'essais à diverses

températures, et nous avons vu que, à 0° environ, l'émulsion de gaïac bleuit très faiblement et très lentement, que la réaction est faible encore à 10°, qu'elle est beaucoup plus apparente et plus rapide à la température ordinaire (26°), qu'elle est encore plus forte à 50°, enfin qu'elle est très forte et immédiate à 70°¹⁾.

Nous reviendrons plus loin sur cette propriété du sable d'activer l'eau oxygénée et, comme nous le verrons, d'autres peroxydes, et de permettre ainsi de les mettre en évidence.

Il était nécessaire de démontrer si cette action était spécifique du sable, ou bien si d'autres substances encore pouvaient, à l'état pulvérulent, activer de façon analogue le peroxyde d'hydrogène; sans entrer dans les détails, nous dirons que des sables de diverses provenances, du verre pilé, du sable de diatomées (Kieselguhr), de la pierre ponce pulvérisée, donnaient tous très fortement la réaction bleue du gaïac en présence d'eau oxygénée; du gyps, de l'oxalate de calcium, du marbre en poudres fines donnaient, quoique moins fortement, la même réaction; enfin des poudres organiques, comme de l'amidon, provoquaient elles aussi, mais lentement et très faiblement l'oxydation du gaïac.

Nous avons dû tirer cette première conclusion que, pour nos recherches, nous devons repousser absolument l'emploi de substances en poudres fines pour l'extraction des ferments à étudier, à moins toutefois qu'il ne fût possible de filtrer l'extrait dans un filtre de porcelaine et de le débarrasser ainsi de toutes particules solides.

c. *La réaction vis à vis des alcalis.*

Quand nous opérions avec la poudre de verre, nous pouvions voir l'émulsion prendre non pas une teinte franchement bleue, mais d'un vert plus ou moins accentué; l'adjonction de faibles quantités d'acide rétablissait la couleur bleue; c'est en effet

1) On peut rapprocher ces observations des résultats obtenus par Bredig au cours de ses belles recherches sur les „ferments inorganiques”. (G. Bredig. — Anorganische Fermente, Leipzig, 1901).

l'alcalinité du verre qui fait apparaître cette teinte verdâtre; cette observation nous a été fort utile dans la suite de nos recherches, car elle nous a mis en garde contre une cause d'erreur pouvant venir fausser certains résultats: par l'emploi d'éprouvettes ayant séjourné quelque temps dans le laboratoire et dont le verre s'est plus ou moins gâté, le liquide devient alcalin, même si les éprouvettes ont été soigneusement lavées, et la réaction des ferments oxydants n'est plus aussi distincte¹⁾.

d. *Réaction provoquée par divers oxydants.*

Nous n'ignorons pas que l'émulsion de gaïac peut s'oxyder et prendre sa couleur bleue caractéristique sous l'influence de nombreuses substances oxydantes; on en trouve cités une foule de cas dans la littérature²⁾; au cours de nos recherches, nous avons eu l'occasion d'étudier, à titre de comparaison, les réactions provoquées par divers composés du manganèse (par exemple par le permanganate de potasse, et par le peroxyde de manganèse) par le peroxyde de plomb, par les sels ferriques, etc.; mais dans la plupart de ces cas, comme ont pu le démontrer nos essais, il ne s'agissait pas de catalyses au sens propre du terme, c'est à dire de réactions où une des substances, dont l'action est disproportionnée à la masse, provoque ou accélère le phénomène et semble n'y pas prendre une part directe. Les combinaisons que nous avons citées participent directement à la réaction; celles par exemple qui, comme H_2O_2 , possèdent le groupement $\begin{array}{c} \text{---}^0 \\ \text{---}_0 \end{array}$ agiront à la façon de l'eau oxygénée, et céderont un de leurs atomes d'oxygène pour oxyder l'acide gaïaconique; mais certains peroxydes (MnO_2 , PbO_2) agissent directement, tandis que d'autres (H_2O_2 par exemple) ont besoin d'être

1) Nous pûmes nous rendre compte que le gaïac décele des traces d'alcali avec une grande sensibilité; en faisant des solutions d'alcalis si diluées que le tournesol ne parvenait pas à les mettre en évidence, le gaïac prenait déjà la teinte jaune caractéristique.

2) Voir à ce sujet les travaux de Schoenbein, Bredig, Sjollema, (Etudes sur les solutions colloïdales d'oxyde de Manganèse), Chodat et ses collaborateurs, Czapek (Biochemie der Pflanzen, II. P. 464), Bertrand (Recherches sur la lac-case), etc., etc.

dédoublés par une peroxydase qui met en liberté de l'oxygène actif. Bien au contraire, les substances pulvérulentes dont nous parlions ci-dessus nous ont paru agir catalytiquement.

e. *Emploi de la solution amidonnée d'iodure de Potassium.*

Outre l'émulsion de gaïac, il nous semblait nécessaire d'utiliser encore d'autres substances pour déceler la présence des ferments oxydants; nous avons déjà dit quelques mots de l'hydroquinone et du pyrogallol qui nous ont paru moins commodes à appliquer au cours de ces recherches préliminaires que l'émulsion de gaïac ¹⁾; mais comme nous rencontrions fréquemment citée dans la littérature la décomposition de l'acide iodhydrique comme réactif d'une application facile, il nous semblait bon de l'essayer; ce réactif, reposant sur le dégagement d'iode à partir d'une solution acidulée d'iodure de potassium et d'amidon soluble, nous a conduit à une série d'observations qui doivent être brièvement discutées ici.

Certains auteurs ont indiqué cette solution comme un réactif des peroxydases; d'autres ont pensé pouvoir mettre les oxydases en évidence par ce dégagement d'iode; il doit certainement y avoir à ce propos un malentendu; car nous avons pu nous rendre compte que la coloration typique de l'amidon apparaît dans la solution amidonnée de KJ dès qu'on y introduit de l'eau oxygénée; il est donc inadmissible de proposer le KJ comme réactif des peroxydases, puisqu'il se décompose sous l'influence de H_2O_2 *sans adjonction de peroxydase*; cette action directe de H_2O_2 , déjà signalée, était prétendue lente et relativement faible, mais on la disait vive et immédiate après adjonction d'une peroxydase; nous ne pouvons pas davantage nous ranger à cette manière de voir: nous avons refait l'expérience un très grand nombre de fois, en variant les proportions de KJ, d'amidon, de H_2O_2 , en variant l'acidité, en supprimant toutes les causes d'erreurs, même les plus invraisemblables que nous pouvions imaginer, et toujours le résultat fut identique: la réaction apparaissait tout

1) Dans des recherches ultérieures, ces réactifs et d'autres encore, utilisés sous certaines conditions, ont donné pourtant des résultats satisfaisants.

aussi rapidement dans les flacons témoins (sans peroxydase) que dans les flacons où nous avons ajouté le ferment, dont nous avons varié la concentration et la provenance. Il nous a donc fallu renoncer à ce réactif, tout au moins en ce qui concerne la mise en évidence des peroxydases. Tout aussi bien, il était inapplicable en ce qui concerne les oxydases; nous venons de dire que le peroxyde d'hydrogène décompose l'acide iodhydrique; d'autres peroxydes, comme MnO_2 , PbO_2 , etc. exercent la même action; si nous nous rappelons maintenant que les „oxydases” sont composées d'une peroxydase et d'un peroxyde, on comprendra que c'est ce peroxyde qui provoque la décomposition de HJ, et non pas le ferment; toutes nos expériences ont en effet confirmé cette supposition, et c'est à cette conclusion que nous nous sommes arrêtés: la réaction au iodure ne peut être prise en considération pour mettre en évidence les ferments, elle ne fait que déceler la présence des peroxydes; une peroxydase sans peroxydes ne peut provoquer la réaction, les peroxydes sans peroxydases provoquent toujours la réaction. Celle-ci n'est point catalytique: elle est très faible et très lente (elle peut n'apparaître qu'après 24 heures) quand les peroxydes sont très peu concentrés, comme c'est le cas chez la plupart des substances qui nous donnaient la réaction d'oxydase. La présence du tanin, tout en gênant dans une certaine mesure la réaction, ne la supprime pourtant pas tout à fait; la température (entre les limites de 0 à 70°) n'a pas une influence appréciable, ni sur la force, ni sur la vitesse de la réaction, qu'il y ait ou non de la peroxydase.

f. *Influence d'un excès d'eau oxygénée.*

Nous devons citer encore un point se rapportant à la critique générale des méthodes et qu'il nous paraît bon de mettre en évidence.

On voit souvent dans la littérature signaler ce fait que, la réaction de la peroxydase étant apparue avec une certaine intensité, la couleur bleue diminue peu à peu pour disparaître bientôt. Nous avons pu, nous aussi, constater cette décoloration

souvent assez rapide de l'émulsion; le ferment avait certainement vu son action supprimée, car à une solution décolorée, si nous ajoutions soit du gaïac, soit une nouvelle quantité de H_2O_2 , la couleur bleue ne réapparaissait que si nous ajoutions une nouvelle quantité de ferment. En outre, notre attention fut bien vite attirée sur ce fait étrange que la décoloration se manifestait à partir du fond du tube; nous ne pouvions d'abord nous expliquer ce phénomène, et nous supposions qu'il se produisait peut-être une réduction dans le liquide, mais que, en contact avec l'O de l'air, cette réduction n'avait pas lieu; mais c'était une simple supposition, et des essais comparatifs nous permirent bien vite de conclure que l'air n'avait pas une influence de cette nature, car en mettant une couche d'huile ou de benzine à la surface du liquide, ou en modifiant le dispositif de l'expérience, nous nous convainquîmes que le liquide au fond du vase se décolorait même s'il était mis en contact avec l'air, et que la surface du liquide restait plus longtemps colorée, même si tout contact avec l'air lui était interdit.

Nous avons pu nous rendre compte que cette décoloration au fond du récipient provenait de ce que nous n'avions pas suffisamment agité l'éprouvette et que les liquides mis en réaction n'étaient pas bien mélangés; c'est l'eau oxygénée qui provoquait la décoloration, et comme, par suite de sa densité, elle était plus concentrée au fond du tube, c'est là que la couleur bleue disparaissait tout d'abord. Dès lors, nous n'avons jamais travaillé sans veiller à ce que les liquides soient très intimement mélangés. Mais le phénomène de la décoloration n'est pas aussi simple qu'il l'apparaît, et si l'eau oxygénée peut en effet avoir une action réductrice, si elle régénère par conséquent l'acide gaïaconique, il devrait y avoir ré-oxydation immédiate et la décoloration ne se manifesterait pas.

Mais tel n'est pas le cas, et nous ne pouvons l'expliquer que par une action destructive (ou paralysante) d'un excès de H_2O_2 sur le ferment. Nous avons pu le démontrer en ajoutant à des émulsions de gaïac contenant des peroxydases de provenance et de concentration variées, d'une part 2 cm³ de notre solution

de H_2O_2 , d'autre part 3 gouttes de cette même solution; dans tous les cas la réaction apparaissait aussi vite dans l'une et dans l'autre des séries, mais elle restait faible dans celle contenant un excès de H_2O_2 et devenait très forte dans celle qui n'en contenait que des traces; dans la première série, la couleur bleue disparaissait bientôt totalement, et elle ne pouvait être rétablie que par l'adjonction d'une nouvelle quantité de peroxydase.

Dans un deuxième essai, nous avons ajouté à des émulsions de gaïac contenant de la peroxydase, un peu de peroxyde d'hydrogène, et cela dans les proportions respectives de 2, 1, $\frac{1}{2}$ cm³, 10, 5, 4, 3, 2, 1 gouttes. Au début, la réaction fut dans tous les tubes aussi forte, et aussi rapide, mais dans ceux contenant beaucoup de H_2O_2 , la décoloration pouvait commencer très vite et être très vigoureuse, de sorte que la réaction n'atteignait même pas le degré qu'elle avait avec moins d'eau oxygénée. En outre, elle disparaissait bientôt totalement. Les tubes avec 1 ou 2 gouttes de peroxyde conservaient, même après 24 heures, leur vive coloration bleue. Il faut donc que le ferment soit détruit par l'excès de peroxyde d'hydrogène, car, dans des conditions normales, son action n'est nullement limitée et nous verrons en effet d'autres essais qui parlent en faveur d'une action catalytique de la peroxydase.

Si l'enzyme est peu concentrée, l'action de H_2O_2 se fera d'autant plus vivement sentir. Au cours d'un essai dans une autre direction, deux tubes contenaient la même peroxydase, environ 10 fois plus diluée chez un tube que chez l'autre; une goutte de notre solution ordinaire d'eau oxygénée faisait apparaître une forte réaction dans le tube où l'enzyme était concentrée, tandis que le tube avec l'enzyme diluée restait à peu près incolore. Ayant opéré de même avec une goutte de H_2O_2 dix fois plus diluée, la réaction apparaissait tout aussi forte dans le premier tube qu'au cours de la première expérience, et très nette aussi dans le second tube.

Les deux expériences suivantes viennent démontrer que la couleur bleue ne disparaît pas, ou du moins qu'elle se rétablit

quand la substance qui active H_2O_2 n'est pas détruite, ou quand elle se régénère: nous verrons que nos levures blanches donnent une réaction de peroxydase bien appréciable; si l'émulsion contient 1 cm^3 de notre solution de peroxyde d'hydrogène, quantité suffisante d'ordinaire à amener la décoloration du bleu de gaïac, cette décoloration, dans ce cas, n'a pourtant pas lieu; nous l'expliquons en admettant que les faibles proportions d'alcool et de H_2O_2 qui se trouvaient dans le liquide ne suffisaient pas pour tuer les levures qui ont continué à sécréter de la peroxydase, de sorte que la décoloration ne pouvait pas se manifester; en ajoutant de plus fortes quantités de solution de gaïac et d'eau oxygénée, les levures étaient tuées et le liquide se décolorait.

Quand on fait le bleuissement du gaïac, comme nous l'avons expliqué, au moyen du sable en présence d'un excès de H_2O_2 , le bleu de gaïac est bien en partie réduit, mais comme le sable n'est pas détruit et que son action n'est pas supprimée, la couleur bleue persiste et s'accroît à la base du tube, dans le voisinage du dépôt de sable.

Le serum du latex de *Castilloa* donne, comme nous le verrons, une très forte réaction d'oxydase; même dans ces conditions (donc sans eau oxygénée), la couleur bleue de la réaction disparaît assez rapidement, et nous supposons que le peroxyde qui participe à cette réaction d'oxydase a peut-être sur le bleu de gaïac la même influence que H_2O_2 ; nous ne voudrions l'affirmer; car il se pourrait que d'autres causes encore provoquassent semblable décoloration, comme la présence de tannin peut-être, ou celle d'autres substances. Mais cette question sera reprise en son temps; pour le moment, quand un auteur remarque le fait que la réaction de peroxydase diminue peu à peu, puis disparaît, on peut se demander s'il a bien tenu compte de cette action d'un excès d'eau oxygénée; en outre, une conclusion s'impose: dans tous les cas, puisque la réaction est aussi forte et aussi rapide avec peu ou beaucoup de H_2O_2 , il sera toujours recommandable de n'utiliser pour faire ces essais, que des traces d'eau oxygénée.

g. Présence de peroxydes dans les vieilles solutions de gaïac.

Nous avons dit plus haut que nous devrions revenir sur la nécessité d'utiliser des solutions de gaïac tout à fait fraîches; nous ne saurions trop y insister, car ce point ne nous semble pas ressortir de la littérature avec une netteté suffisante, et pourtant il s'agit là d'une source d'erreurs fréquemment négligée. Les auteurs affirment bien qu'il ne faut pas utiliser des émulsions vieilles, mais il est urgent d'appuyer cette assertion par des exemples et par des chiffres, et de démontrer que non seulement l'émulsion, mais aussi la solution alcoolique de gaïac doivent être préparées immédiatement avant d'être employées. La teinture de gaïac et d'autres solutions alcooliques qu'on trouve dans le commerce sont généralement préparées depuis longtemps et ne sont donc pas utilisables pour le but que nous poursuivons.

Si nous revenons sur ce point, c'est que les déboires réservés, faute d'indications suffisantes, à tout débutant, ne nous ont pas été épargnés, et que, au commencement de nos recherches, toute une série de résultats ont dû être considérés comme erronés parce que le gaïac utilisé par nous était trop vieux. De la littérature, nous avons compris en effet que, par gaïac frais, il fallait entendre une solution qui n'aurait pas séjourné pendant des semaines ou des mois dans une bouteille, mais nous pensions, en conservant dans une burette 100 cm³ de la solution alcoolique, quantité qui, vu nos nombreux essais, était épuisée en peu de jours, que nous restions dans des limites convenables. Or tel n'était pas le cas: nous nous aperçûmes bientôt que le même extrait où nous recherchions de l'oxydase nous donnait à quelques minutes d'intervalle des résultats positifs ou négatifs; ces derniers étaient obtenus avec une solution fraîche de gaïac, les résultats positifs avec une solution de la veille ou de l'avant-veille; nous avons alors fait quelques expériences méthodiques et nous nous sommes rendu compte qu'il faut déjà considérer comme „vieilli" du gaïac dissous depuis quelques heures dans l'alcool.

En effet, dans cette solution, qui s'oxyde lentement à l'air, il se forme très rapidement des peroxydes dont la présence, cela va sans dire, s'oppose à utiliser la solution pour faire la réaction des „oxydases”, puisque ce gaïac peroxydé, en présence d'une peroxydase, donnera une couleur bleue qu'on pourrait attribuer à tort à une oxydase ¹⁾. Il est bien évident que puisque pour mettre en évidence les peroxydases, on ajoute toujours des peroxydes à la solution, l'emploi de gaïac vieilli n'aura, dans ce cas, pas les inconvénients qu'il aurait comme réactif des oxydases.

On fera bien cependant d'effectuer *toujours* le contrôle des réactifs par les méthodes que nous indiquons ici, et que nous avons utilisées dans tous les cas, dès le moment où nous nous sommes rendu compte que nous faisons fausse route.

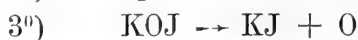
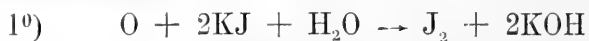
Puisque nous admettons, ainsi que nous l'exposerons plus loin, que, dans un extrait qui donne la réaction d'„oxydase”, il se trouve toujours des peroxydes, il sera bon, quand on obtient avec un extrait le bleuissement direct du gaïac, de contrôler si cet extrait contient bien des peroxydes (on utilisera pour cela la réaction au iodure amidonné, comme nous l'avons exposée ci-dessus).

Puis comme le sable, — nous l'avons vu, — active les peroxydes et provoque ainsi l'oxydation de l'acide gaïaconique en bleu de gaïac, nous avons là un moyen tout indiqué pour reconnaître s'il se trouve des peroxydes, même en très faibles traces, dans notre solution de gaïac, et avant chaque série d'essais, nous avons toujours eu recours à un témoin contenant du sable et démontrant que notre gaïac était bien dépourvu de peroxydes et par conséquent utilisable.

A la place du sable, pour démontrer la présence de peroxydes dans le gaïac, on pourra utiliser également la solution iodurée amidonnée qui donne une indication assez exacte et très élégante; on opérera comme suit: à une solution non acidulée

1) Ces peroxydes se formant rapidement dans une solution vieillie de gaïac ont déjà été signalés par les auteurs.

de KJ et d'amidon soluble on ajoute un peu d'une solution vieillie de gaïac; l'émulsion se colore en bleu, par suite de l'oxydation du gaïac, ce qui pourrait peut-être s'expliquer de la façon suivante par une réaction à trois phases: les peroxydes contenus dans le gaïac vieilli céderaient d'abord un atome d'oxygène et on aurait:



le iodure de potassium se régénère et l'atome d'oxygène naissant se porte sur l'acide gaïaconique pour l'oxyder en bleu de gaïac.

Si au contraire, avant de faire la réaction, on a acidulé la solution au iodure et à l'amidon, elle prend, par l'adjonction de gaïac vieilli, une belle couleur violette provenant de la coloration de l'amidon par l'iode mis en liberté:



De la résine de gaïac en morceaux assez gros conservée depuis longtemps dans le laboratoire pouvait, sans inconvénient, être utilisée; les morceaux s'étaient peut-être oxydés à leur surface, mais il semble que la résine n'était pas profondément modifiée.

Une solution alcoolique *saturée* ne présente pas tous les désavantages d'une solution *diluée*; des peroxydes s'y forment beaucoup plus lentement, et semblable solution pourrait être utilisée sans aucun doute plus longtemps, mais nous avons préféré ne pas courir le risque de voir nos résultats accidentellement faussés, et nous avons toujours employé des solutions préparées depuis peu, à partir de résine fraîche.

h. *Echelle colorimétrique*

Pour ne pas rester dans des termes un peu trop arbitraires, nous avons essayé, vers la fin de nos recherches, d'établir une échelle de couleurs à laquelle nous pourrions comparer nos réactions de gaïac et exprimer par un chiffre leur force approximative; ce procédé, quoique un peu grossier, nous a donné de bons résultats, et nous comptons l'utiliser dans la suite. Nous avons

préparé des solutions à 1‰ et 1% d'indigo-carmin, et nous les avons diluées plus ou moins, jusqu'à obtenir l'échelle suivante (nous indiquons à gauche le numéro d'ordre, le degré des réactions, et à droite les expressions que nous employons parfois pour caractériser les réactions).

N°	Solution d'indigo	Eau	Solution alcool. de gaïac 2%	Force de la réaction.
1	$\frac{2}{10}$ cm ³ à 1‰	10 cm ³	2 cm ³	Excessivement faible.
2	$\frac{5}{10}$ 1‰	10	2	Très faible.
3	1 1‰	9	2	Faible.
4	3 1‰	7	2	Assez faible.
5	5 1‰	5	2	Bonne.
6	7 1‰	3	2	Assez forte.
7	1 1%	9	2	Forte.
8	2 1%	8	2	Très forte.
9	4 1%	6	2	Excessivement forte.

Nous avons ainsi une très jolie échelle d'un bleu à peu près égal à celui du bleu de gaïac, et très régulièrement ascendante des degrés 1 à 9. Nous l'utiliserons fréquemment au cours de nos recherches.

B. Essais concernant plus spécialement les ferments oxydants du thé.

I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE.

Comme nous l'avons dit, deux tendances se manifestent actuellement pour expliquer la fermentation du thé : certains auteurs admettent que ce phénomène a lieu exclusivement sous l'influence d'enzymes existant dans la feuille et augmentant au cours de la préparation du thé, d'autres préfèrent voir dans les transformations que subit la feuille de thé, un procès de fermentation microbiologique, avec action exclusive (ou du moins prépondérante) de levures. Depuis que les questions de ferments sont à la mode, on s'est peut-être un peu trop laissé guider par des théories préétablies, et on a admis que, la fermentation du thé étant une oxydation, elle *devait* être favorisée par les ferments se trouvant éventuellement dans la feuille; nous ne voulons pas prétendre dès maintenant que cette théorie ne répond pas à la réalité des faits; nous voulons seulement dire que, jusqu'à présent, elle n'a pas été démontrée de façon irréfutable, et que le fait de rencontrer des ferments oxydants dans les feuilles de thé n'implique pas *a priori* que ces enzymes jouent un rôle dans le processus de la fermentation, les enzymes ayant très vraisemblablement un rôle utile à jouer dans la vie de la plante. Nous avons évidemment affaire, dans la fermentation du thé, à un phénomène excessivement complexe, et s'il est vraisemblable que des enzymes contenues dans la feuille entrent en jeu, il est très possible aussi que des levures jouent un rôle dans telle partie du procès, et il est certain que des facteurs encore inconnus doivent entrer en ligne de compte; à notre avis, c'est ainsi que, au commencement de ces recherches, le problème doit se poser. Avant de

passer à la discussion de nos expériences, nous devons brièvement résumer les publications concernant ce sujet; nous laissons de côté la question des levures que nous avons déjà sommairement exposée dans une précédente publication, et sur laquelle nous reviendrons plus en détail en temps utile. Neuville¹⁾ discute un peu plus à fond ces données bibliographiques et donne une liste des ouvrages consultés; nous y renvoyons le lecteur désireux de connaître les travaux originaux.

Bamber²⁾ a le premier reconnu dans la feuille du thé la présence d'un ferment oxydant; Nanninga³⁾, à peu près à la même époque, a porté également son attention sur ce point; le premier de ces auteurs, et peu après lui Mann⁴⁾, ont fait d'intéressantes recherches sur cette enzyme, et d'autres encore s'en sont occupés. Il faut relever ici ce fait que tous considèrent ce ferment (nommé par Newton⁵⁾ „*théase*”) comme une *oxydase*; seul Nanninga qui, dans ses premières allusions à ce ferment⁶⁾, parle d'une oxydase, dit dans des notes manuscrites laissées par lui à Buitenzorg que: „l'extrait aqueux du „ferment ne donnait aucune coloration bleue avec de la teinture de gaïac fraîchement préparée, ce qui démontre l'absence „d'une oxydase; par adjonction d'un peu d'eau oxygénée, apparaissait immédiatement une couleur bleue intense, et cela „aussi bien avec de la teinture de gaïac préparée depuis un „certain temps déjà. Selon la littérature sur les oxydases et „les peroxydases, cette réaction serait caractéristique pour les „*peroxydases*.” Mais l'idée qu'il s'agit d'oxydases est si forte que Neuville, P. 52, s'exprime comme suit: „Outre l'oxydase, „il existe encore dans la feuille de thé une peroxydase et une „catalase sur lesquelles nous ne pouvons être que très bref, „en raison de l'obscurité où l'on se trouve à leur égard.”

1) Neuville. Technologie du thé. (Paris, 1905).

2) Bamber. Report on Ceylon tea soils... (1900).

3) Nanninga. 7e verslag over de onderzoekingen... (1900).

4) Mann. The ferment of the tea leaf. I. II. III. (1902, 1903, 1904).

5) Newton. Loc. cit.

6) Nanninga. Onderzoekingen omtrent de theefabrikatie. (Teysmannia, XII, P. 223, 1901).

Remarquons toutefois que Mann, qui travaillait avant que les peroxydases aient été bien étudiées, a certainement eu la notion de ces ferments et qu'il distingue dans son enzyme deux parties: l'une („enzyme active“) bleuisant directement l'émulsion de gaïac, l'autre qui ne fait cette réaction qu'en présence d'eau oxygénée. Il nomme „enzyme totale“ l'ensemble des enzymes oxydantes contenues dans la feuille et il admet que l'enzyme active serait une oxydase, tandis que l'autre partie serait vraisemblablement un *zymogène* inactif (ou pro-enzyme), qui acquerrait ensuite les propriétés actives de l'enzyme définitive. Pour nous, d'après ce que nous savons actuellement de ces ferments, nous sommes convaincus que ce „zymogène“ de Mann n'était pas autre chose qu'une peroxydase.

Rappelons que, dans notre précédente publication sur les levures, nous disions ¹⁾: „Jusqu'ici, nous ne sommes parvenus „à isoler de la feuille de thé, soit fraîche, soit flétrie, que de „la peroxydase.“ Depuis lors, nous avons repris nos recherches et modifié notre manière de voir, et nous exposerons plus loin notre opinion sur la nature de ces enzymes du thé et les raisons qui peuvent expliquer les divergences entre les divers auteurs.

Quant aux fonctions de ces ferments, la principale serait, d'après les auteurs, l'oxydation du tanin et de l'huile essentielle, le dédoublement d'un glucoside, etc. Il est très possible que cela soit exact, mais ce n'est nullement démontré jusqu'ici, et nous ne saurions nous ranger à l'opinion un peu trop schématique, et en tout cas prématurée, dont nous trouvons un écho chez Neuville quand il affirme, P. 50: „Avec la théase, „nous sommes en présence d'une substance qui régit toute la „préparation industrielle des feuilles de thé“ et qu'il ajoute, P. 117: „La fermentation normale paraît devoir se faire sous „l'influence exclusive de l'enzyme.“ Il dit encore, P. 118: „Toutes „les données empiriquement acquises sur la fermentation du „thé.... concordent parfaitement avec ce que nous savons des

1) Bernard. Sur la présence de levures... (P. 17).

„propriétés de l'enzyme"; cette assertion n'est certainement pas exacte; justement l'empirisme a démontré par exemple que la température où se fait le mieux la fermentation du thé, ne doit pas dépasser 28 à 29° C., tandis que la température optimum des enzymes est en général bien plus élevée; en outre, n'oublions pas que les peroxydases ont pour action de rendre actif l'oxygène des peroxydes, soit des peroxydes ajoutés à la solution, soit, selon Bach et Chodat, des peroxydes organiques (oxygénases) participant à la constitution des „oxydases". Ce serait donc par cette mise en liberté d'O actif, propriété de ces enzymes, que la fermentation aurait lieu; or Mann a démontré que l'adjonction d'O sous forme active n'accélère ni ne régularise la fermentation; enfin, nous l'avons dit, le mode d'action des ferments sur les divers constituants de la feuille n'est pas encore démontré, et c'est d'une façon un peu arbitraire que Mann a prétendu voir un rapport direct entre l'arome et l'enzyme, ou que Bamber a émis l'opinion que l'enzyme doit avoir davantage de rapport avec la force et la couleur du produit.

Nous relevons dans les recherches des divers auteurs quelques points qu'il importe de résumer un peu plus en détail, car ils seront utiles à la discussion ultérieure de nos observations, soit en ce qui concerne le thé plus spécialement, soit en ce qui concerne en général les ferments oxydants.

Bamber pensait que l'enzyme du thé, substance donnant les réactions des oxydases, deviendrait active quand elle serait en présence des acides mis en liberté au cours du roulage, car elle agit le mieux en milieu faiblement acide; tout en admettant que l'enzyme est plus abondante dans les jeunes feuilles, il ne pense pas pourtant que l'arome soit en relation avec la quantité d'oxydase; selon lui, elle jouerait bien un rôle capital dans la fermentation du thé, mais son influence se manifesterait surtout sur la force et la couleur du produit.

Newton a décrit, pour mettre la „théase" directement en évidence dans la feuille, une méthode microchimique que nous devons rappeler en quelques mots, car nous aurons certainement

à y faire allusion quand, au cours de nos prochains travaux, nous reprendrons la question de la localisation des ferments dans les tissus de la plante de thé. Cet auteur a opéré de la façon suivante (cité d'après Neuville, P. 52): „De petits fragments de feuilles et de tiges jeunes sont plongés pendant quelques jours dans une solution alcoolique d'acétate de cuivre. Des coupes microscopiques sont faites ensuite dans ces fragments et lavées pendant une ou deux secondes avec une solution aqueuse très faible d'acétate de fer; portées sous le microscope, ces coupes montrent que, dans presque toutes les cellules, il y a eu précipitation du tanin. Si l'on fait alors agir la teinture de gaïac sur ces coupes, en la faisant pénétrer sous le couvre-objet, on voit que les cellules externes se colorent d'abord en bleu, puis que de petits globules apparaissent dans d'autres parties de la feuille, principalement dans les faisceaux fibro-vasculaires. Cette recherche est assez délicate; la section entière peut se colorer en bleu intense, et s'obscurcir ainsi de manière à rendre toute observation impossible". Les quelques essais que nous avons faits jusqu'ici en application de ce procédé ne nous ont pas paru satisfaisants, et il nous semble que la méthode ne peut donner de bons résultats, parce que les sels de cuivre et de fer, ainsi que nous l'avons montré dans la discussion des méthodes, donnent la réaction au gaïac, sans ferment; or, un lavage de quelques secondes ne débarrassera pas de l'acétate de cuivre les coupes qui, du reste, ne sont pas lavées après leur passage dans l'acétate de fer, substances qui certainement viendront donner des indications fausses et pourront faire croire à tort à la présence d'une oxydase dans les tissus.

Newton a indiqué, dans les racines de la plante de thé la présence d'une quantité notable de „théase”.

Les savants qui, à Buitenzorg se sont occupés de la fermentation du thé, n'ont pas fait des recherches approfondies sur la présence et sur le rôle d'une enzyme dans le phénomène; v. Romburgh et Lohmann ont, par leurs essais de fermentation en présence de chloroforme, expériences reprises ensuite par

Nanninga, voulu démontrer que la fermentation se produit indépendamment de tout élément vivant; plus tard, peu avant son départ, Nanninga a isolé du thé une peroxydase et, se rencontrant en ceci avec plusieurs enzymologues spécialistes des ferments oxydants, il semble vouloir admettre que l'action de la peroxydase du thé est due aux combinaisons de manganèse qui entrent dans sa constitution; ces recherches n'ont pas été publiées, et il va bien sans dire que nous ne nous sentons pas en droit de les discuter plus à fond; nous ne les citons ici que pour mémoire, et à cause des intéressantes conclusions auxquelles l'auteur avait abouti.

Nous n'avons plus maintenant que quelques mots à dire des recherches de Mann, l'auteur qui a étudié le plus en détail les ferments oxydants de la feuille du thé, et, bien que nos conclusions s'écartent parfois de celles de cet auteur, nous ferons souvent appel à sa grande autorité en la matière, et nous baserons le plus souvent nos essais sur les méthodes qu'il a établies.

Nous avons déjà dit que la distinction établie par l'auteur dans son „enzyme totale”, entre une „enzyme active” et un zymogène ne nous paraît plus être conforme à nos connaissances actuelles des oxydases et peroxydases, mais nous devons ajouter que, si cette conception nous paraît maintenant un peu désuète, elle pouvait, au moment où Mann publiait ses résultats, fort bien se soutenir, et elle n'enlève rien à la valeur de ses belles recherches.

Ayant isolé l'enzyme par une méthode que nous indiquerons tout à l'heure, Mann a réussi à provoquer, au moyen de cette substance, l'oxydation de divers corps facilement oxydables, et il prévoit qu'elle agira de même sur les tanins, huiles essentielles et autres composants de la feuille de thé; Bamber et Wright¹⁾ ayant traité par la théase une solution de tanin du thé ont pu constater le brunissement du liquide. Puisque cette action sur le tanin est notoire, il devient nécessaire, pour extraire l'enzyme, d'éliminer préalablement le tanin, et

1) Bamber and Wright. — Indian Gardening 1902.

c'est là-dessus que repose la méthode de Mann; nous nous contentons de la citer ici, nous la discuterons plus loin: il prend 10 gr. de feuilles de thé fraîches et les broie intimement avec 5 gr. de poudre de peau; il en obtient une masse pâteuse dans laquelle le tanin est fixé par la poudre de peau; la pâte est traitée à l'eau où on la laisse macérer pendant deux heures, puis on exprime le suc à travers une étoffe; on a ainsi une solution aqueuse qui, selon Mann, est dépourvue de tanin, et qui contient les enzymes.

En appliquant cette méthode, et en titrant par l'émulsion de gaïac les quantités relatives d'enzyme, Mann conclut que la quantité d'enzyme devient de moins en moins forte à mesure qu'on s'éloigne de l'extrémité du rameau, qu'elle augmente au cours du flétrissage, et qu'elle est plus forte chez des plantes donnant un produit plus haut coté sur le marché ¹⁾; et l'auteur pense qu'il y a relation entre la quantité d'enzyme et la qualité du thé, et en particulier avec l'arome du produit; il y aurait selon toute probabilité, dit Neuville, une action de l'enzyme sur l'huile essentielle et sur le glucoside, qui favoriserait la formation de nouveaux corps aromatiques.

Si certaines parties de la plante, comme les tigelles par exemple, qui contiennent une forte proportion de théase, ne donnent pas un produit apprécié, c'est, disent les auteurs, parce que ces organes ne contiennent pas les substances oxydables sur lesquelles doit porter l'action de l'enzyme (entre autres les tanins).

Mann affirme encore que la théase est très sensible à la chaleur, qu'elle est très active à 54°, que son action est beaucoup plus faible à 62° et qu'elle cesse probablement tout à fait au delà de cette température. Bamber et Wright ont remarqué qu'elle agit le mieux en milieu faiblement acide, mais qu'une certaine proportion d'acides, surtout d'acides minéraux, la détruit. Les alcalis agiraient eux aussi sur l'action de l'enzyme, mais à un moindre degré que les acides.

1) Mann, dans ses analyses, donne des chiffres se rapportant à l'„enzyme active" ou oxydase, et à l'„enzyme totale", mais c'est la première que lui paraît caractéristique et c'est à la proportion de cette substance qu'il attache de l'importance.

II. RECHERCHES SPÉCIALES. 1)

a. *Influence du tanin et d'autres substances oxydables sur la réaction.*

Ayant constaté les lacunes nombreuses qui existent dans l'étude des enzymes de la feuille de thé, il était nécessaire, après s'être mis au courant des méthodes et avoir discuté leur valeur, de reprendre très exactement et très méthodiquement ces recherches encore très imparfaites, et il nous a paru urgent, avant tout, de refaire en utilisant les mêmes procédés, les expériences des divers auteurs, et notamment celles de Mann.

Nous avons voulu agir d'abord de façon purement qualitative, afin de nous orienter, et nous avons pris des quantités arbitraires de diverses parties de la plante de thé, que nous broyions dans un mortier avec un peu d'eau; le suc extrait par filtration de ces broyats, était alors ajouté à de l'émulsion de gaïac préparée avec une solution tout à fait fraîche de résine, puis à de l'émulsion additionnée de traces de H_2O_2 . Les premiers résultats ainsi obtenus nous frappèrent bien vite par leur discordance. Le plus souvent, nous obtenions une réaction d'oxydase nulle; à peine parfois le gaïac prenait-il une teinte légèrement bleuâtre, et nous pensions alors que notre première assertion, conforme aux indications sommaires de Nanninga, se confirmerait, à savoir qu'il n'est pas possible de mettre une oxydase en évidence dans la plante de thé. Mais de plus, la réaction de peroxydase nous apparaissait très irrégulièrement, tantôt très forte, tantôt nulle ou excessivement faible; cela nous frappa d'autant plus vivement quand, opérant de façon un peu plus exacte, en prenant des quantités toujours les mêmes des divers organes, il nous semblait travailler dans des conditions qui nous paraissaient toutes comparables. Nous

1) Depuis que ce travail est à l'impression, les recherches ont été poursuivies et sous certains rapports ont conduit à des résultats qui venaient compléter et dans quelques cas modifier les données exposées ici. Ces nouvelles études seront publiées en leur temps.

nous sommes demandé alors si une substance n'était pas présente qui viendrait empêcher d'apparaître l'une et l'autre des réactions, et nous avons pensé tout d'abord au tanin, puisque les auteurs disaient qu'il fallait avant tout éliminer le tanin pour pouvoir extraire l'enzyme.

Pour contrôler cette influence éventuelle du tanin, nous avons fait les essais suivants :

Des feuilles de thé broyées dans de l'eau et exprimées dans un morceau d'étoffe donnent un suc qui, en général, ne montre pas de réaction d'oxydase, et qui ne montre qu'une réaction de peroxydase excessivement faible, quelquefois à peine perceptible. Si cet extrait est conservé quelque temps, il devient très brun et montre généralement alors une réaction de peroxydase un peu plus forte; nous nous l'expliquons par ce fait que, le tanin s'étant oxydé, il ne gêne plus l'oxydation des autres substances oxydables; en effet, si l'extrait frais est traité quelque temps à la poudre de peau qui en élimine une partie du tanin, on a le plus souvent une réaction d'oxydase plus ou moins nette et une réaction de peroxydase souvent très forte.

Ces faits furent contrôlés un grand nombre de fois, soit avec de grandes quantités de feuilles dont toute la masse était exprimée, soit par des essais en plus petit, portant sur des feuilles d'âges différents ou sur d'autres organes de la plante de thé: toujours les suc expérimentés tels quels étaient incapables de donner les deux réactions en question, ou bien ils les montraient à un faible degré, tandis que les suc traités à la poudre de peau permettaient de constater la présence bien nette des ferments oxydants.

Nous sommes allés plus loin; nous avons traité des suc quelques minutes, ou $\frac{1}{2}$ heure, ou deux fois $\frac{1}{2}$ heure à la poudre de peau; nous en avons laissé d'autres en contact pendant un jour, ou plus, avec la poudre de peau; dans d'autres cas enfin, les feuilles ayant été broyées à plusieurs reprises dans de l'alcool absolu, ont été traitées à l'eau, et le filtrat obtenu a été intimement mélangé trois fois pendant une heure à la poudre de peau; nous avons ainsi des suc de moins en

moins riches en tanin, et nous croyons pouvoir affirmer que plus le suc contenait de substances tanniques, plus les réactions qui nous intéressent étaient faibles; nous disons que nous croyons pouvoir l'affirmer, car nos expériences à ce sujet ne sont pas encore définitives: nous n'avons pas encore travaillé de façon quantitative, et c'est seulement par des procédés qualitatifs (par le FeCl_3) que nous avons décelé dans nos sucres la présence de tanin. Toute cette question devra être reprise, car elle est compliquée et pourrait être d'un grand intérêt dans la pratique. Il faudra étudier les nombreux facteurs qui interviennent: l'influence des diverses substances tanniques ou d'autres combinaisons de nature analogue, leur action selon leur concentration, la limite à laquelle elles agissent, leur effet selon les substances oxydantes et oxydables en présence desquelles elles se trouvent, etc. En tout cas, pour l'instant, nous pouvons affirmer que même après un contact prolongé avec la poudre de peau, même après macération à l'alcool et traitement répété à la poudre de peau, les extraits obtenus par nous réagissaient encore avec le chlorure de fer. Certainement l'acide tannique peut, après ce traitement, être totalement éliminé, mais il n'en est pas de même de l'acide gallique, substance tout aussi oxydable, et qui, comme il est facile de le démontrer, gêne la réaction du gaïac de la même manière que l'acide tannique; pour cette raison, il nous semble impossible que, par la méthode très simple indiquée par Mann, on puisse obtenir des résultats comparables et que les chiffres donnés par cet auteur puissent être considérés comme étant absolument exacts; puisque les substances tanniques sont impossibles ou du moins très difficiles à éliminer complètement; puisque d'autre part, elles exercent une influence très sensible pour empêcher l'oxydation du gaïac, il ne sera pas possible, dans ces conditions, d'opérer de façon quantitative, et il nous semble que ce point déjà (nous en relèverons d'autres) enlève de leur valeur aux assertions qui veulent que le ferment diminue d'une feuille à l'autre ou qu'il augmente au cours du flétrissage; on pourrait nous dire que, pour avoir des données exactes, il faut extraire l'enzyme et la

purifier; mais on n'ignore pas que l'enzyme, même extraite avec le plus grand soin, n'est pas encore pure, qu'il faut pour la purifier plusieurs opérations délicates, au cours desquelles on perd des quantités notables du ferment, et que, par conséquent on n'aurait plus de données quantitatives.

Nous indiquons plus loin la méthode que nous avons appliquée et qui nous a servi à préparer l'enzyme du thé presque totalement débarrassée de substances tanniques.

Nous avons fait encore les expériences suivantes: ayant extrait le suc de feuilles de thé et l'ayant traité à la poudre de peau jusqu'à ce qu'il donnât, bien distinctes, les deux réactions, nous y avons ajouté de l'acide tannique ou de l'acide gallique, etc. en diverses proportions et nous avons vu ces substances exercer une influence certaine sur les réactions qu'elles gênaient fortement et finissaient par arrêter tout à fait; c'est ainsi par exemple qu'en ajoutant au suc de l'acide tannique dans la proportion de 1‰, les deux réactions étaient déjà plus faibles qu'avant l'adjonction; une proportion d'acide tannique de 2‰ avait supprimé totalement la réaction d'oxydase et rendu très faible et très lente la réaction de la peroxydase. Le même résultat fut obtenu avec une solution aqueuse de l'enzyme précipitée par l'alcool et presque complètement dépourvue de tanin.

On pouvait se demander de quelle nature était l'action du tanin; il serait invraisemblable que cette action portât sur le ferment lui-même, puisque justement il semble démontré que la peroxydase active l'oxydation des substances tanniques; des expériences nous ont fait comprendre que c'est sur la réaction elle-même que le tanin agit, et nous nous l'expliquons de la façon suivante: quand, dans une solution, il se trouve deux substances facilement oxydables, comme l'acide gallico-gallique et un tanin, et une substance oxydante, l'action de cette dernière pourra se porter de préférence sur l'une des deux autres, soit parce qu'une de ces deux substances sera plus facilement oxydable que l'autre, soit parce qu'elle aura plus d'affinité avec la substance oxydante; ce cas n'est pas isolé en chimie, et les essais sui-

vants nous paraissent en donner une démonstration péremptoire¹⁾.

Nous avons ajouté du sable à une émulsion de gaïac vieilli (peroxydé), ce qui, comme nous l'avons expliqué dans la discussion des méthodes, donne une bonne coloration bleue; si, à la solution, on avait ajouté du tanin, la couleur bleue n'apparaissait pas; du sable ajouté à une émulsion de gaïac frais donnait, en présence de traces de H_2O_2 , une très forte réaction bleue; en présence de tanin, la réaction ne se manifestait pas, ou restait excessivement faible; de même, la réaction de peroxydes variés sur le KJ amidonné est entravée et finit par s'arrêter en présence d'acide tannique, d'acide gallique ou d'autres substances tanniques; cette réaction pourtant est moins fortement influencée que celle du gaïac: du peroxyde de manganèse donne directement avec l'émulsion de gaïac une très forte réaction bleue; si dans le liquide on a dissous un peu d'acide tannique, la réaction n'a pas lieu.

Nous avons commencé quelques essais en séries qui seront repris dans la suite si la nécessité s'en fait sentir:

- A. 10 tubes contenant des solutions de plus en plus concentrées d'acide tannique (de 1‰ à 1%) et de plus en plus diluées de KJ amidonné et acidulé, plus 2 gouttes de H_2O_2 .
- B. Tubes témoins contenant la solution au iodure et l'eau oxygénée dans les mêmes proportions, mais pas de tanin.
- C. Tubes contenant les mêmes solutions de tanin que A, émulsionnées avec une vieille solution de gaïac (peroxydée) et additionnées d'un peu de suc de thé riche en peroxydase.
- D. Tubes témoins.

Tandis que, dans la série B, la réaction diminuait insensiblement d'intensité du premier tube au dixième, dans la série A, elle diminuait rapidement du premier au cinquième tube, elle était presque nulle dans le sixième et n'apparaissait pas dans les quatre derniers.

1) L'influence du tanin sur les réactions des ferments oxydants a été signalée depuis longtemps; Schoenbein entre autres l'a mise en évidence; quant à notre conception de cette action des substances tanniques, elle correspond à peu près à celle de Hunger, quand il dit (Ber. d. d. bot. Gesellschaft, 1901) que certaines substances réductrices, comme des sucres, peuvent gêner la réaction.

L'influence de l'acide tannique était plus marquée encore avec le gaïac: dans la série D, chez tous les tubes la réaction était identique et assez forte, dans la série C, elle était déjà moins forte dans le premier tube, faible dans le second, à peine perceptible dans le troisième et nulle dans les sept autres. Il en était de même si, au lieu de gaïac péroxydé, on avait pris du gaïac très frais additionné d'eau oxygénée; l'action du tanin était un peu moins sensible, sans doute parce que le peroxyde activé du gaïac a un pouvoir oxydant moins fort que celui de H_2O_2 .

Le fait que, en présence de tanin, la réaction de la peroxydase est entravée, et l'explication que nous en avons donnée, sembleraient s'opposer à l'action catalytique de la peroxydase, que nous admettons plus loin; mais il faut se rappeler que c'est l'eau oxygénée, dont les quantités sont limitées, qui est l'agent direct de l'oxydation, et la quantité de cette substance doit par conséquent elle aussi entrer en ligne de compte.

Tous ces essais nous montrent combien il faudra attacher d'importance à la présence du tanin dans les réactions, et combien il sera imprudent d'affirmer qu'on a des analyses quantitatives des enzymes, tant qu'on ne travaillera pas en l'absence des tanins. Nous avons répété des essais en suivant très exactement les prescriptions de Mann, et jamais nous n'avons eu des sucs dépourvus de tanins; en prenant des quantités identiques de feuilles, en les traitant tout à fait de la même façon, en y ajoutant les mêmes quantités de poudre de peau, en les diluant avec des quantités égales d'eau, nous obtenions des sucs dans lesquels le chlorure de fer réagissait toujours, mais de façon inégale, et qui donnaient avec le gaïac des réactions d'oxydase différentes. Toutefois, nous verrons qu'un traitement de quelques minutes à la poudre de peau élimine déjà suffisamment de tanin pour que la réaction de l'oxydase puisse apparaître et pour que le peroxydase ne soit presque plus gênée dans son action; cette méthode sera donc satisfaisante pour effectuer la détermination qualitative des enzymes.

A titre de comparaison, il nous semblait intéressant de répéter rapidement ces quelques essais chez d'autres plantes

dans des organes plus ou moins riches en substances oxydables; c'est ainsi que, après avoir saigné des plantes de *Castilloa elastica*, nous séparions du caoutchouc un serum qui devenait très rapidement brun foncé à l'air et qui pourtant donnait une réaction excessivement forte d'oxydase; cela semblait venir en contradiction avec nos observations sur le thé, mais cette anomalie n'était qu'apparente, car selon une communication verbale de M. Gorter, ce ne serait pas du tanin, mais de l'acide chlorogénique qui se trouverait dans ce serum et provoquerait sa coloration brune; il semblerait donc que cet acide n'exerçât pas d'influence sur la réaction, ou du moins pas à un même degré que l'acide tannique ou que l'acide gallique, car en ajoutant à ce serum un peu de l'un ou l'autre de ces acides, la réaction d'oxydase n'apparaissait plus. Le suc extrait de la petite graminée (*Paspalum platycaulon*) à laquelle nous faisons de fréquentes allusions, suc presque totalement dépourvu de tanin, contenait une active peroxydase et des peroxydes relativement abondants et donnait par conséquent une bonne réaction d'oxydase; ce suc voyait ses deux réactions gênées, puis supprimées par une adjonction de substances tanniques. Il en était de même avec des sucS extraits de la pulpe de fruits bien mûrs, sucS ne contenant pas de tanin et donnant (fruits de *Carica Papaya*) une très forte réaction de peroxydase, ou bien (fruits d'*Acras Sapota*) une très forte réaction de peroxydase et une bonne réaction d'oxydase; ces réactions étaient supprimées par l'adjonction de tanins. Des pelures de bananes, contenant une forte proportion de tanin, ne donnaient pas de réactions, mais traitées avec la poudre de peau, elles donnaient une bonne réaction d'oxydase et décelaient une très active peroxydase. Chez l'écorce de fruits de *Garcinia Mangostana*, il se passe peut-être quelque chose d'analogue à ce que nous avons signalé chez le serum de *Castilloa*; le suc qu'on extrait de ces écorces devient très rapidement brun à l'air; il donne cependant une très forte réaction d'oxydase, qui disparaît si, à ce suc, on ajoute une solution d'acide gallique, ou un peu du jus riche en tanin de l'écorce des bananes.

Pouvons-nous maintenant tirer de ce qui précède quelques indications en ce qui concerne la fermentation du thé? On a prétendu que la théase augmente si l'on passe des vieilles feuilles aux feuilles plus jeunes, qu'elle augmente également au cours du flétrissage par exemple; mais est-on bien sûr de pouvoir émettre cette opinion? connaît-on les quantités absolues de l'enzyme? ou bien même, est-on certain d'avoir enlevé partout des quantités proportionnelles de tanins, qui permettraient de dire que les résultats obtenus sont relatifs et par conséquent comparables entre eux? n'est-il pas probable par exemple que, quand on prend du thé déjà flétri, une partie du tanin s'étant déjà oxydée, la réaction ne soit par conséquent plus entravée par des quantités équivalentes de tanin oxydable?

Il nous paraît préférable de dire que c'est la présence du tanin qui peut empêcher parfois de mettre en évidence les ferments oxydants présents dans les divers organes de la plante de thé.

b. *Peroxydases et „oxydases” dans la plante de thé.*

Puisque nous n'avions pas encore pu trouver la méthode nous permettant d'extraire des feuilles toute la quantité d'enzyme qui s'y trouve, et de la débarrasser des substances comme le tanin qui gênent sa réaction, il nous a paru préférable de nous en tenir pour le moment à des indications qualitatives. Du reste, peu importe, puisqu'il s'agissait d'abord de déterminer la nature, plutôt que la quantité des ferments oxydants des diverses parties de la plante de thé.

Les quelques rares indications quantitatives que nous donnons ne peuvent avoir qu'une valeur toute provisoire et seront reprises en leur temps, comme aussi les recherches concernant la localisation de ces enzymes dans les tissus, leur spécificité, puis les expériences sur leur importance pratique dans la fermentation du thé, et autres questions connexes.

D'ordinaire, et sauf avis contraire, nous avons appliqué la méthode très simple suivante: nous avons broyé les feuilles ou autres organes à étudier, avec de la poudre de peau; nous avons laissé macérer suffisamment longtemps, de telle façon

qu'une bonne partie du tanin fût fixée par la poudre de peau; nous diluions ensuite la masse ainsi obtenue avec un peu d'eau, et nous filtrions sur le vide. Nous avons ainsi un filtrat assez clair (souvent, surtout quand il s'agissait de feuilles âgées, plus ou moins coloré en vert), contenant encore du tanin, mais suffisamment pur cependant pour donner de façon très satisfaisante les diverses réactions.

Dans ces conditions, nous avons obtenu certains résultats qui nous obligent à revenir sur notre précédente assertion, à savoir que nous n'avions pas pu mettre en évidence d'oxydases dans la feuille de thé; nos nouvelles expériences, entreprises après élimination partielle du tanin nous ont conduits à un résultat en apparence tout différent de celui acquis précédemment: nous avons en effet obtenu le plus souvent une coloration directe du gaïac; nous étions donc en présence d'une *réaction d'oxydase* (nous ne disons pas d'une „oxydase”) en général assez faible, pourtant d'ordinaire très appréciable. Cette réaction montrait une irrégularité remarquable, c'est-à-dire qu'elle était fort variable d'une feuille à l'autre de la même branche, d'un organe à l'autre de la même plante, ou encore dans les sucs extraits d'un même organe, mais placés dans des conditions différentes.

Cette irrégularité, ou inconstance de la réaction d'oxydase (d'autres disent instabilité) a été constatée à plusieurs reprises chez d'autres plantes; c'est ainsi que, outre les divergences qui se manifestent parmi les auteurs qui se sont occupés des enzymes du thé, nous pouvons relever encore l'opinion de Chodat et Bach, qui à plusieurs reprises ont affirmé que la peroxydase est beaucoup plus stable que l'oxydase¹⁾, puis celle de Betting²⁾ qui, dans ses travaux sur les ferments oxydants du tabac, a facilement mis en évidence une peroxydase, mais est arrivé à la conclusion que l'existence d'une oxydase est douteuse. Il nous a semblé que c'est là un point important pour la

1) Entre autres dans leurs „Recherches sur les ferments oxydants”, P. 17.

2) Betting. Bijdrage tot de kennis der Tabaksfabrikatie (Cultuurgids II, Afl. 6, 1909). — Over oxydase en peroxydase in de tabak (Cultuurgids, II, Afl. 10, 1909).

théorie générale, et qu'il était nécessaire de le relever avec quelque insistance.

Les mêmes sucres qui nous donnaient la réaction d'oxydase nous donnaient aussi, sauf de rares exceptions, la réaction des peroxydes avec la solution acidulée d'iodure de potassium et d'amidon; la réaction se manifestait en général très lentement, preuve qu'il n'existe dans ces sucres que des quantités excessivement faibles de peroxydes; elle finissait pourtant par être souvent bien distincte: le liquide prenait une teinte violacée plus ou moins accentuée.

Si la coloration directe du gaïac par les sucres était très irrégulière, il en était tout autrement de sa coloration en présence de H_2O_2 . Toujours, si les conditions de l'expérience étaient comparables, si aucune des influences qui gênent la réaction (excès de tanin, excès de H_2O_2 , présence de substances réductrices, etc.) n'entraînait en jeu, les sucres donnaient une réaction de peroxydase excessivement forte, et tandis que les réactions d'oxydase variaient entre les degrés 0 à 4 de notre échelle colorimétrique, la peroxydase donnait une réaction atteignant toujours les degrés 8 et 9.

Des expériences préliminaires nous ont démontré que si nous utilisions des sucres de plus en plus dilués, la réaction d'oxydase devenait de plus en plus faible, et *restait* faible; ayant atteint un certain degré, elle ne le dépassait pas. Bien au contraire, la peroxydase ayant été diluée, son action était de plus en plus lente, mais elle finissait par devenir dans tous les tubes excessivement forte, à moins que, l'enzyme ayant été trop diluée, la faible réaction qu'elle donnait ne fût influencée par la quantité ajoutée d'eau oxygénée.

Ces essais ont été répétés avec les sucres extraits de divers organes de la plante et notamment des feuilles d'âges divers, prises à divers moments de la fermentation, avec des enzymes obtenues plus ou moins pures par précipitation dans l'alcool, et ils nous ont toujours fourni les mêmes indications. Inutile de dire que nous avons, dans tous les cas, toujours comparé les données acquises avec des tubes témoins, et que nous avons

éliminé toutes les causes d'erreur possibles discutées dans la première partie de ce travail; nous croyons donc pouvoir prétendre que des détails de technique n'ont pu venir fausser nos résultats.

Nous avons, toutes les fois que c'était possible, travaillé dans des conditions comparables, en laissant macérer des quantités identiques de feuilles avec les mêmes quantités de poudre de peau pendant le même laps de temps, et en diluant ensuite avec les mêmes quantités d'eau.

Les tableaux suivants, qui résument un très grand nombre d'essais faits dans les conditions les plus variées, viendront appuyer ce qui précède, à savoir que, dans les divers organes de la plante de thé, la peroxydase donne une réaction qui varie dans de faibles limites, tandis que la réaction d'oxydase varie sans régularité: on ne peut la voir diminuer des feuilles jeunes aux feuilles plus âgées, ni s'accroître d'un stade à l'autre de la préparation.

Les chiffres correspondent aux degrés de notre échelle colorimétrique.

	Réaction d'„oxydase”.	Peroxydase.
Jeunes racines	3—4	7—8
Vieilles racines	0—1	7—8
Cotylédons	2—4 (rarement 5)	7—8
Germe (peu après la germination)	3—5	8—9
Ecorce brune des branchettes	3—4 (rarement 5)	8—9
Extrémité encore verte des tiges	2—5	8—9
Vieilles feuilles	3—5	8—9
3 ^e feuille	3—4	8—9
2 ^e feuille	3—4	8—9
1 ^e feuille	3—4	8—9
Bourgeon (Pekoe)	2—4	8—9

On remarquera que des organes en état de vie très active, comme le germe peu après le début de son développement, ont les plus fortes réactions d'oxydase, que les jeunes racines

en voie de croissance donnent une réaction plus forte que des racines âgées; les jeunes feuilles par contre, peut-être par suite de leur teneur élevée en tanin, donnent une réaction d'oxydase moins forte que les vieilles.

La *peroxydase* au contraire, sauf chez les racines et les cotylédons, où il semble que des substances peuvent venir légèrement gêner sa réaction ¹⁾, donne partout une réaction très régulière, toujours la même, plus ou moins lente selon la concentration du suc, mais toujours finalement excessivement forte.

D'autres séries d'expériences de contrôle ont donné des résultats identiques à ceux exposés dans le tableau ci-dessus :

	Réaction d'„oxydase”	Peroxydase
Jeunes racines	3—4	8
Vieilles racines	0—1	8
Cotylédons	3—4	7—8
Ecorce brune des branchettes	3—5	9
Tigelles encore vertes . . .	2—5	9
Vieilles feuilles	4—5	9
2 ^{es} et 3 ^{es} feuilles.	2—4	9
Pekoe et 1 ^{es} feuilles	2—4	9

Les chiffres ci-dessus se rapportent donc à la présence des ferments oxydants dans les divers organes de la plante; si maintenant on prend les divers stades de la préparation, on arrivera à des résultats identiques: on verra qu'il n'y a pas davantage de régularité dans les chiffres de la réaction d'oxydase, tandis que la peroxydase donne au contraire des réactions toujours excessivement fortes (voir le 3^e tableau, P. 39).

La réaction de la peroxydase est plus rapide avec le suc de C, sans doute parce que le tanin en est plus facilement enlevé que dans les feuilles qu'il faut broyer. Dans la catégorie F, la réaction de la peroxydase est également plus rapide, et nous

1) Chez les cotylédons par exemple, la réaction est nettement retardée, peut-être par la saponine abondante.

	Réaction d'„oxydase”	Peroxydase
A. Feuilles prises à la fin du flétrissage	1	8—9
B. Feuilles prises à la fin du premier roulage	3	8—9
C. Suc exprimé des feuilles au cours du second roulage	3	9
D. Feuilles prises au commencement de la fermentation	3	8—9
E. Feuilles prises au milieu de la fermentation	1—3	8—9
F. Feuilles prises à la fin de la fermentation	1—2	9

supposons que, dans ce thé complètement fermenté, la plus grande partie du tanin étant oxydée, la réaction est moins vivement entravée. Après quelque temps cependant les réactions de peroxydase sont dans tous les tubes de la même force. Si, dans la catégorie A, la réaction d'oxydase est plus faible, cela tient sans doute à ce que ces feuilles flétries sont plus difficiles à broyer que les autres.

Il ressort en tout cas de ces chiffres qu'il n'est pas possible de mettre en évidence une augmentation de la quantité d'enzyme au cours de la préparation, que la peroxydase reste constante et que la réaction d'oxydase est au moins aussi forte, sinon plus forte, dans la feuille roulée que dans la feuille fermentée.

Les conclusions que nous pensons pouvoir tirer de ce qui précède concernant la nature de ces enzymes sont les suivantes: 1^o si aucun agent ne vient gêner la réaction, la peroxydase en présence de peroxydes, donne une action disproportionnée avec sa masse et théoriquement illimitée, 2^o la vitesse de la réaction de la peroxydase est dépendante de la concentration de l'enzyme, mais la réaction elle-même n'est point influencée par la masse de l'enzyme, elle est finalement toujours excès-

sivement forte; l'action de la peroxydase est donc nettement catalytique ¹⁾.

Chez la réaction d'oxydase, au contraire, nous avons pu faire de tout autres constatations: l'intensité de la réaction est limitée, elle n'est pas constante, elle est certainement influencée par la concentration de l'„oxydase", elle n'a nullement les allures d'une réaction catalytique.

Nous avons déjà vu que, selon la théorie de Chodat et Bach, l'oxydase serait constituée par un peroxyde et une peroxydase; or, comme nous venons de voir que la peroxydase a une action illimitée tandis que la réaction d'oxydase est nettement limitée, nous devons conclure que cette réaction est dépendante de la quantité très faible des peroxydes existant dans les extraits et sur lesquels porte l'action de la peroxydase pour donner la „réaction d'oxydase". Nous pouvions en effet répéter en quelque sorte artificiellement une „réaction d'oxydase" à effet limité, si nous diluions tellement l'eau oxygénée qu'il ne s'en trouvait plus que des traces dans l'émulsion de gaïac à laquelle nous ajoutions de la peroxydase: une fois tout le peroxyde d'hydrogène décomposé, la réaction s'arrêtait.

Les différents faits que nous venons d'exposer nous ont donc conduits à la conclusion qu'on ne peut considérer l'„oxydase" comme un ferment dans le sens strict du terme.

c. Préparation de l'enzyme ²⁾.

Pour étudier les propriétés de ces enzymes, et notamment de la peroxydase du thé, nous avons appliqué la méthode suivante ³⁾, qui nous permettait d'avoir un ferment totalement ou

1) Dans leurs „Recherches sur les ferments oxydants", Chodat et Bach ont mis en évidence, (pp. 15, 31), ce pouvoir catalysateur de la peroxydase.

2) Nous ne pouvons attribuer à ce ferment le nom de *théase*, car il est impossible de donner à une peroxydase, un nom qui a défini jusqu'ici une oxydase. Il ne nous a pas paru nécessaire de créer un nouveau terme pour l'enzyme étudiée ici, et nous continuerons à l'appeler „peroxydase du thé", réservant ainsi la question de sa spécificité éventuelle.

3) Au cours de recherches ultérieures le mode de préparation de l'enzyme a été quelque peu amélioré.

presque totalement dépourvu de substances tanniques à savoir : on exprime dans une forte presse, et sans les broyer au préalable, une bonne quantité de feuilles fraîches (au moins 2 kilos); le suc qui s'en écoule est immédiatement reçu dans de la poudre de peau, il est filtré sur le vide, reçu de nouveau dans de la poudre de peau; cette opération ayant été répétée quelques fois, on obtient un suc qui reste clair et presque incolore à l'air; on le verse dans de l'alcool fort, et quand le précipité floconneux est bien formé, on filtre.

Nous obtenions ainsi sur le filtre une masse pâteuse en petite quantité, qui ne représentait, cela va sans dire, qu'une très minime partie des ferments contenus dans les feuilles exprimées; cette masse blanchâtre était soluble dans l'eau et donnait de façon très accentuée la réaction de la peroxydase; elle ne donnait que d'une façon très irrégulière et inconstante la réaction d'oxydase. Nous ne donnons pas davantage de détails sur la peroxydase ainsi obtenue, son étude plus approfondie devra être reprise ultérieurement. Elle nous a servi à faire la plupart de nos expériences, elle est très active et semble être très stable. Comme elle n'était pas toujours parfaitement purifiée et qu'elle pouvait contenir encore de faibles proportions de tanin, elle prenait alors à l'air une coloration brune; nous l'avons en général conservée dans l'alcool, où elle gardait fort longtemps ses propriétés.

d. *Résistance de l'enzyme du thé vis à vis de la chaleur.*

Nous n'avons pas encore fait tous les essais qui nous permettraient d'indiquer exactement les caractères distinctifs de la peroxydase du thé, et nous nous contenterons ici, en attendant d'avoir fait des expériences plus complètes et plus méthodiques, de donner quelques indications préliminaires sur la résistance de cette enzyme vis à vis de certains agents, et notamment vis à vis d'une élévation de la température (des essais ultérieurs préciseront l'optimum d'action de ce ferment). Les remarques exposées ci-dessous démontrent que cette peroxydase est très résistante, et qu'elle se comporte vis à vis des

différents agents, en particulier de la température, d'une façon bien spéciale, et qui n'est pas identique à la manière de se comporter d'autres peroxydases connues; ce fait vient à l'appui des théories sur la spécificité de certains ferments oxydants, sur laquelle les auteurs, entre autres Chodat et ses collaborateurs ¹⁾ ont insisté à plusieurs reprises.

Nos expériences ont porté sur la température à laquelle la réaction est visiblement gênée, et aussi sur le temps pendant lequel le ferment doit être soumis à une température de 100° environ pour que son action soit diminuée, puis détruite.

Nos essais ont été, pour une partie du moins d'entre eux, assez concluants, et sans vouloir les exposer tous dans leurs détails, nous les résumerons comme suit: nous avons chauffé pendant 10 minutes environ, à des températures variant entre elles de 5 degrés entre 30 et 100 degrés, de petites quantités de ferments de diverses provenances qui, à la température ordinaire du laboratoire (25—27°) donnaient une réaction caractéristique de peroxydase; des essais préliminaires nous ayant démontré que la température critique était entre 70 et 80°, nous travaillions alors entre ces deux points à des températures variant entre elles de 1 à 2° seulement. Après avoir constaté, à titre de comparaison que des ferments extraits des fruits mûrs d'*Aceras Sapota* avaient une action déjà très fortement diminuée aux environs de 45° et que des ferments extraits de concombres mûrs étaient sensibles à des températures plus basses encore, nous pûmes nous rendre compte que la peroxydase du thé était beaucoup plus résistante. Les enzymes de thé étaient étudiées soit directement dans le suc exprimé des feuilles fraîches broyées et plus ou moins débarrassé de son tanin, soit après avoir été plus ou moins purifiées par la précipitation à l'alcool, comme il a été indiqué plus haut.

Dans tous les cas, nous avons obtenu des résultats à peu près concordants: à toutes les températures entre 25 et 75°,

1) A part les travaux de Chodat et Bach, voir encore à ce propos: „La spécificité de la tyrosinase”, par Chodat et Staub (Nouvelles recherches sur les ferments oxydants, Arch. Sc. phys. et natur. Genève, 1907).

la peroxydase se manifestait finalement avec la même force; la réaction était il est vrai un peu plus rapide aux températures les plus basses, mais il n'y avait pas de différences brusques entre les différents termes de la série; et puis, si après 2 minutes de réaction, la teinte bleue de l'émulsion variait entre les degrés 5 et 7 de notre échelle de couleurs, après 5 minutes, il n'était presque plus possible en général de percevoir de différence, tous les tubes ayant d'ordinaire atteint les degrés 8—9. Mais entre 75 et 80°, et plus précisément vers 78°, la réaction était brusquement beaucoup plus lente et beaucoup plus faible; après 5 minutes, elle n'atteignait guère que le degré 3—4 et après 10 minutes elle était encore brusquement plus faible que les précédentes; au-dessus de cette température, il n'était d'ordinaire pas encore possible, après 10 minutes, de voir se manifester la réaction; nous ne poursuivions pas l'expérience plus longtemps, car en attendant davantage, la réaction finissait par se manifester dans les autres tubes, puisque nous ne les avons soumis que 10 minutes environ aux diverses températures, et dans ces conditions les ferments du thé ne sont pas encore détruits. Nous avons porté notre attention également sur la réaction d'oxydase qui se manifestait dans la plupart des sucres mis en expérience; nous avons pu le plus souvent constater une concordance très manifeste entre les deux réactions; sans doute, la réaction d'oxydase, beaucoup plus faible, était beaucoup plus lente également, mais finalement, dans tous les tubes où la peroxydase était apparue, la réaction d'oxydase se manifestait aussi, et elle était d'autant plus faible et plus lente que la peroxydase agissait plus faiblement et plus lentement; nous avons tiré de ces faits des arguments pour nous expliquer la nature de cette réaction d'oxydase.

Dans de rares cas seulement, et notamment dans le suc que nous avons exprimé de *Paspalum platycaulon*, il nous a semblé que la réaction de l'oxydase disparaissait plus vite que celle de la peroxydase; nous avons pensé que les peroxydes qui prenaient part dans ce suc à la réaction de l'oxydase étaient peut-être tout particulièrement instables.

De cette première série d'essais, nous pouvons tirer la conclusion suivante: de quelque manière qu'aient été obtenues les enzymes, la température à laquelle leur activité diminue brusquement est caractéristique pour chacune des différentes peroxydases que nous avons étudiées, mais pour un ferment donné, disons par exemple celui du thé, elle est constante et semble être indépendante de la pureté de l'enzyme.

Nous avons dit ci-dessus que l'enzyme du thé chauffée dix minutes à 78° n'avait pas encore perdu toute activité; au cours de notre deuxième série d'essais, nous avons voulu nous rendre compte pendant combien de temps l'enzyme peut être chauffée à 100° avant d'être totalement détruite; pour cela, nous avons chauffé au bain-marie de petites quantités de ferment que nous laissions séjourner de 1 à 30 minutes à une température voisine de 100°.

Si du suc exprimé des feuilles de thé était ainsi traité, il ne donnait plus de réaction de peroxydase déjà après avoir été chauffé pendant 3 à 5 minutes; après 2—3 minutes déjà, la réaction était fortement ralentie et affaiblie. Au contraire, la solution aqueuse de l'enzyme purifiée par précipitation dans l'alcool donnait, après avoir été chauffée 1—3 minutes, une réaction un peu ralentie, il est vrai, et d'abord affaiblie, mais qui pourtant atteignait assez vite une très forte intensité; la solution ayant été chauffée plus longtemps (4—10 minutes), la réaction était plus lente encore, mais après un certain temps, elle était aussi très forte; chauffée plus de 10 minutes, la peroxydase ne donnait plus de réaction.

Dans un autre cas, la peroxydase semblait plus résistante encore et donnait, même après avoir été chauffée 20 minutes, une réaction qui n'apparaissait plus si la solution avait été chauffée 25—30 minutes. Plus la solution avait été chauffée longtemps, plus la réaction était lente; c'est ainsi par exemple que l'enzyme non chauffée donnait une couleur bleue correspondant, après 2 minutes de réaction, au degré 8 de notre échelle colorimétrique, tandis que l'enzyme chauffée à des températures variant de 2 à 20 minutes, donnait une réaction

diminuant respectivement du degré 7 au degré 2. Après 15 minutes de réaction, l'enzyme non chauffée avait une couleur bleue du degré 9, les solutions chauffées variaient de 8 à 5; après $\frac{3}{4}$ d'heure environ, les solutions chauffées avaient atteint une intensité de réaction variant de 9 à 6.

La réaction d'oxydase donna des résultats identiques à ceux obtenus dans notre première série d'expériences: souvent très lente et très faible, souvent même à peine distincte, elle se manifesta pourtant dans la plupart des cas où la réaction de peroxydase était visible.

En résumé, tandis que, dans notre première série d'essais, nous étions arrivés à ce résultat que la température à laquelle l'action du ferment diminue brusquement était constante, ici nous devons tirer de tout autres conclusions: le temps pendant lequel l'enzyme doit être chauffée pour être totalement détruite semble, pour la peroxydase extraite d'une plante donnée, ne pas être toujours le même; nous n'avons pas encore pu déterminer avec certitude à quoi doivent être attribuées ces anomalies; il est permis toutefois de supposer que le degré de pureté du ferment joue un rôle dans ces réactions; nous avons en effet déjà mis en évidence l'influence que les tanins par exemple, et d'autres substances, peuvent exercer sur la manière d'agir des ferments oxydants; de nos observations, il semble résulter que plus l'enzyme est pure, plus longtemps il faut la chauffer pour qu'elle perde son activité.

Nous nous sommes demandé si la disparition de la réaction sous l'influence d'un séjour prolongé à une température de 100° devait être attribuée à une destruction complète de l'enzyme ou seulement à une paralysie passagère; nous avons répété l'expérience, et avons essayé l'enzyme 24 heures après l'avoir chauffée; l'énergie de la peroxydase ne s'était point régénérée, et la réaction n'apparaissait pas plus que le jour précédent.

Dans un de nos essais, nous avons chauffé à 100° deux tubes contenant la même peroxydase, mais dans l'un dix fois plus diluée que dans l'autre; (l'enzyme avait été chauffée suffisamment longtemps pour que son action soit ralentie, mais non

supprimée); tandis qu'après une demi-heure la réaction marquait le degré 7 dans le flacon d'enzyme concentrée, elle n'était pas encore apparue dans l'autre tube; nous nous demandions si la concentration du ferment devait entrer en ligne de compte pour expliquer l'action de la chaleur, mais l'essai suivant nous a démontré qu'il n'en était rien: au lieu d'utiliser notre solution ordinaire d'eau oxygénée, nous prîmes une solution encore 10 fois plus diluée, dont nous utilisâmes deux gouttes pour faire la réaction; dans le flacon à enzyme diluée, la réaction apparut, il est vrai plus lentement que dans l'autre, mais finalement avec tout autant d'énergie; nous étions donc ici encore en présence de l'influence d'une trop grande concentration de l'eau oxygénée, qui agissait plus rapidement sur les petites quantités de bleu de gaiac formé. On voit donc combien il est important, pour mettre en évidence les peroxydases de n'utiliser que des traces de H_2O_2 .

e. *Stabilité de la peroxydase.*

On a souvent prétendu que, les enzymes étant très instables, il convient de travailler rapidement pour les étudier; tel n'est certainement pas le cas avec la peroxydase du thé qui, quoi qu'on en ait dit, est à coup sûr très stable; certains extraits, il est vrai, qui donnaient la réaction d'oxydase, perdaient ce pouvoir assez rapidement sous des conditions déterminées, cela parce qu'ils contiennent des peroxydes instables; mais toutes les peroxydases que nous avons étudiées conservaient très longtemps leur pouvoir, même sans que nous ayons pris des précautions spéciales pour les conserver; des suc exprimés de diverses plantes, des enzymes plus ou moins pures en solutions aqueuses, ou conservées à l'état sec ou dans l'alcool donnaient, encore après des jours et des semaines, même parfois lorsque les suc étaient plus ou moins putréfiés, leur réaction de peroxydase tout aussi fortement qu'à l'état frais. Une enzyme du thé qui nous a servi à beaucoup d'essais avait été précipitée par l'alcool le 28 février et conservée dans l'alcool; elle était à la fin de mars tout aussi active qu'au premier jour; sa

réaction d'oxydase était même peut-être encore accentuée, surtout si nous prenions l'enzyme qui s'était un peu desséchée sur les parois du flacon; nous nous l'expliquons par le fait que, dans ces conditions, l'enzyme, ou plutôt les impuretés avec lesquelles elle était mélangée, s'étaient oxydées lentement à l'air, formant des peroxydes qui pouvaient alors être activés par la peroxydase.

Un suc de feuilles de thé presque totalement débarrassé de tannin, récolté au mois de Janvier et conservé sans autres précautions, donnait au commencement d'avril, une réaction de peroxydase encore excessivement forte, et une très faible réaction d'oxydase. Les peroxydases étudiées par nous ont donc conservé longtemps leur action, même indépendamment de toute adjonction antiseptique.

f. *Résistance de la peroxydase vis à vis de divers agents.*

Nous avons commencé quelques expériences sommaires pour nous orienter dans diverses méthodes permettant de caractériser les enzymes, en recherchant en particulier quels agents autres que la chaleur peuvent entraver leur action. On a souvent décrit des ferments comme étant empoisonnés par des proportions plus ou moins fortes de substances vénéneuses; les „ferments inorganiques” sont, d'après Bredig empoisonnés par les mêmes agents qui entravent l'action des ferments organiques; mais la résistance des substances catalysatrices vis à vis des influences extérieures est très variable, et dépend sans doute de l'état physique sous lequel elles se trouvent. C'est ainsi par exemple que, d'après nos essais, l'action catalysatrice de MnO_2 n'est „empoisonnée” ou paralysée ni par le sublimé corrosif, ni par l'acide cyanhydrique, ajoutés dans des proportions qui gênent fortement (ou qui suppriment même) les réactions d'oxydase et de peroxydase du suc de *Castilloa* et du suc extrait de l'écorce des mangoustans. De même le suc de thé, ou la solution aqueuse d'enzyme en présence de ces deux poisons ont leur réaction de peroxydase ralentie et bientôt supprimée. Une goutte d'acide chlorhydrique ajoutée au suc de thé ou au suc de *Paspalum platycaulon* font dispa-

raître les deux réactions; Bamber et Wright ont déjà mis en évidence la sensibilité de la „théase” vis à vis des acides minéraux; les acides organiques sont moins actifs; cependant quelque excès d'acide acétique ajouté au suc de *Paspalum* ou au suc de thé supprime la réaction d'oxydase et affaiblit fortement la réaction de peroxydase en la ralentissant.

Nous avons déjà parlé des essais que Nanninga a entrepris à la suite de v. Romburgh et Lohmann: ces auteurs ont vu des feuilles brunir rapidement dans les vapeurs de chloroforme et ils ont prétendu qu'elles avaient *par conséquent* fermenté sans intervention de microorganismes. Il était, à notre avis, peut-être imprudent de conclure de ces expériences en petit que la feuille était „fermentée”; nous avons fait quelques essais à ce propos et nous avons pu constater que, si l'action de la peroxydase du thé n'est pas gênée même par une agitation prolongée avec le chloroforme et que si, en effet, la feuille ayant séjourné dans les vapeurs de cette substance prend bien vite une couleur brune assez régulière, il est malaisé de se rendre compte si la feuille a vraiment les caractères de la feuille fermentée; il est par exemple très difficile de saisir l'odeur du thé à cause de l'odeur du chloroforme longtemps persistante; cette substance, en effet, imprègne les tissus, comme on peut s'en convaincre par la saveur fortement sucrée qu'ont acquise ces feuilles. La question n'est donc nullement résolue, on le voit, par ces essais préliminaires, et il ne sera possible de tirer des conclusions de quelque certitude que sur des essais portant sur de grandes quantités de feuilles et où l'on aura éliminé autant que possible les causes d'erreurs.

g. Influence de la lumière sur les peroxyases.

Il est un point qui devra, dans la suite, retenir notre attention, c'est la question de la lumière, encore très controversée en ce qui concerne le thé; en général, on admet qu'une lumière trop vive détruit rapidement les enzymes, et, peut-être en se laissant influencer quelque peu par cette idée, des auteurs ont voulu affirmer qu'ils rencontraient en effet des proportions moins

fortes d'enzymes chez des feuilles cueillies pendant les heures chaudes du jour, que chez des feuilles cueillies le matin; Bamber et Wright par contre ont dit que l'enzyme est abondante à toutes les heures du jour. La question, on le voit, est loin d'être résolue, mais comme, dans la pratique, il semble bien qu'on ait raison d'appliquer les méthodes empiriques consistant à cueillir le thé de préférence le matin, et à le flétrir, puis à le fermenter à l'abri de la lumière, il importe de reprendre scientifiquement et méthodiquement cet important problème. Nous pouvons en attendant citer un fait qui s'y rattache indirectement, à savoir l'influence que semble exercer la lumière sur la formation des peroxydes, et par conséquent sur la réaction d'oxydase, si, dans la solution, il se trouve une peroxydase.

Nous avons à plusieurs reprises placé des solutions diluées de gaïac dans des flacons ouverts ou hermétiquement fermés, soit à la lumière, soit à l'obscurité; toujours nous avons pu voir que, dans ces conditions, les solutions placées à l'obscurité, même conservées à l'abri de l'air, contenaient, après un jour environ, bien plus de peroxydes que les solutions laissées à la lumière. De même des sucres de *Paspalum platycaulon* qui, au moment de l'extraction, montraient de bonnes réactions d'oxydase, donnaient cette réaction tout aussi nette après un séjour de quelques heures à l'obscurité, tandis que les mêmes sucres laissés à la lumière, étaient devenus tout à fait inactifs. Il semble que des extraits de thé donnaient des indications analogues. La peroxydase par contre était aussi forte dans l'un que dans l'autre cas; il n'y avait donc pas eu action sur le ferment, mais bien influence de l'obscurité pour favoriser la formation de peroxydes dans ces sucres (ou bien peut-être influence de la lumière pour hâter leur destruction?)

N'y a-t-il pas là une indication en ce qui concerne la fermentation du thé? s'il est démontré que la fermentation a lieu à l'obscurité dans de meilleures conditions qu'à la lumière, on peut se l'expliquer en admettant qu'alors des peroxydes en plus grande quantité pourront se former dans la feuille, sur lesquels

agira la peroxydase contenue dans les cellules et mise en liberté au cours du roulage.

h. Présence de peroxydase dans les levures.

Sans vouloir insister longement sur cette partie de notre travail qui sera reprise en détail ultérieurement, nous devons pourtant dire deux mots des quelques essais que nous avons entrepris sur les levures, isolées par nous à partir du thé en voie de fermentation, en ce qui concerne les ferments oxydants qu'elles pourraient sécréter; il s'agit de la levure blanche-laitieuse dont nous avons parlé dans notre précédent travail, déjà cité.

Nous avons recherché, chez ces levures, dont nous avons préparé un grand nombre de cultures, la sécrétion éventuelle d'oxydase et de peroxydase; en ce qui concerne la réaction d'oxydase, nous avons, sans aucune exception, toujours obtenu des résultats négatifs; bien au contraire en ce qui concerne la peroxydase, nous avons souvent eu de bonnes réactions, plus ou moins fortes selon les circonstances, mais en tout cas toujours distinctes; les cultures vieilles, celles mêmes âgées de trois ou quatre jours seulement, se sont montrées en général moins favorables que les jeunes; celles-ci, quand elles s'étaient développées, soit sur agar, soit en milieu liquide pendant 24 heures, donnaient les meilleurs résultats; les réactions étaient identiques à peu près si les levures avaient été broyées ou si elles étaient restées entières et vivantes dans le réactif; il se pourrait cependant, et ce point devra être éclairci, qu'il y eût parmi ces levures des races plus ou moins actives, les réactions étant parfois plus ou moins fortes, sans que nous puissions reconnaître la raison de ces différences.

Comme nous voulions, avant de commencer des expériences méthodiques, prévoir toutes les objections et les écarter si possible, nous nous sommes demandé si les milieux plutôt que les levures ne pouvaient pas provoquer les réactions; nous avons toujours travaillé avec de l'agar-agar, et cette substance, comme nous avons pu nous en convaincre n'oxyde pas le gaïac; pas

davantage les milieux solides ou liquides que nous utilisions ne provoquaient de réaction en l'absence des levures.

On pouvait supposer aussi que les levures pouvaient agir non pas par la peroxydase qu'elles excrétaient, mais seulement parce que, étant de fines particules, elles pouvaient provoquer une réaction à la façon des poudres, dont nous avons discuté l'action précédemment; on pouvait voir en effet la réaction commencer dans le fond du tube près du dépôt des levures et s'élever de là dans la masse du liquide; mais ayant chauffé les levures jusqu'à les tuer, nous pûmes nous persuader que c'est bien comme éléments vivants et non comme fines particules qu'elles agissent.

L'excrétion de la peroxydase nous semble démontrée par l'expérience que nous avons déjà relatée au cours de notre discussion des méthodes, à propos de l'action d'un excès de H_2O_2 . Nous avons dit que si le gaïac et l'eau oxygénée sont dans des proportions insuffisantes pour tuer les levures, celles-ci continuant à sécréter de la peroxydase, agissent continuellement sur l'émulsion pour l'oxyder, et que la couleur bleue ne peut en disparaître, puisqu'elle se reforme au fur et à mesure; même après 24 heures, le liquide a conservé sa couleur; bien au contraire, si le liquide contient une enzyme en quantité limitée, et dont l'action est paralysée par H_2O_2 qui en même temps réduit le bleu de gaïac, le liquide se décolore en quelques heures; de même si aux levures on ajoute la solution alcoolique de gaïac et l'eau oxygénée en quantités suffisantes pour que les cellules soient tuées, la couleur bleue disparaît bien vite et ne peut réapparaître, puisqu'il n'y a plus excrétion de ferment.

i. *Mode d'action des ferments oxydants.*

Nous n'insisterons pas, pour le moment, sur le mode d'action des ferments oxydants constatés dans la feuille de thé, cette question devant être reprise en détail; nous avons déjà mis en évidence le fait que la peroxydase a une action nettement catalytique, tandis que la réaction d'oxydase est au contraire limitée.

On a prétendu que l'action des ferments oxydants, notam-

ment des peroxydases était provoquée par des combinaisons de manganèse qu'ils contiennent ¹⁾, on a même été jusqu'à dire que le ferment du thé est vraisemblablement un sel organique non azoté de manganèse.

Nous ne saurions considérer cette opinion comme démontrée; certainement il y a, dans l'enzyme du thé, du manganèse que nous avons pu constater, comme nous avons contrôlé sa présence dans tous les organes et dans tous les extraits de la plante de thé. Mais nous croyons qu'il est permis de dire qu'on n'a pas encore obtenu jusqu'ici le ferment à un état de pureté assez grande pour qu'il soit possible d'affirmer que le Mn fait partie intégrante du ferment. Les cendres du thé, contenant du Mn donnent en effet comme tant d'autres combinaisons du Mn, l'oxydation du gaïac; mais cela ne veut pas dire que c'est parce qu'il contient du Mn que le ferment donne la même réaction; l'allure de la réaction des cendres et celle de la réaction de la peroxydase nous ont semblé du reste toutes différentes l'une de l'autre et ne pas correspondre à la quantité de Mn qu'elles contiennent respectivement; les cendres, avec beaucoup de Mn donnent une réaction plus faible que la peroxydase qui n'en a que très peu. De plus, il paraissait imprudent d'affirmer que c'est la présence de Mn qui provoque la réaction d'oxydase, car dans le serum de *Castilloa* par exemple, qui avait une réaction d'oxydase si intense, nous n'avons pas pu, par le moyen de la fusion dans la soude et le salpêtre, mettre en évidence du Mn. On sait que Bach également a obtenu au cours de ses récents travaux, des ferments oxydants libres de Mn.

Ce sont là du reste des points qui, pour le moment n'ont qu'une importance secondaire; que se soit du Mn ou tout autre métal qui provoque la réaction, que ce soit la nature chimique ou physique d'une substance, (son état colloïdal par exemple)

1) Bertrand (voir entre autres Comptes Rendus 1897) a attribué à la présence de Mn une certaine partie de l'activité de l'oxydase (Laccase).

Voir encore, à propos de l'action des solutions colloïdales de manganèse, les travaux de B. Sjolhem, entre autres dans Chemisch Weekblad, VI, 1909, P. 287.

ce sont autant de problèmes qui devront être étudiés par la suite; ce qu'il fallait avant tout, c'était contrôler, puis discuter la réaction elle-même, en laissant de côté les agents qui peuvent la provoquer. Il s'agira ensuite d'étudier quel rôle les ferments jouent dans l'économie du végétal; ce point, que nous avons seulement effleuré, aura certainement pour la pratique la plus grande importance; nous devons démontrer quelles sont les substances qui, dans la feuille fraîche, sont modifiées par les ferments, puis quelle est l'action de ces ferments dans la feuille en voie de fermentation, etc. Pour le moment, nous n'avons que quelques rares données concernant cette question, et nous les rapportons ici comme toutes provisoires. Que la peroxydase agisse sur le tanin du thé et sur les substances tanniques en général, ou du moins sur certaines d'entre elles, cela nous semble ne pas faire de doute si nous considérons les résultats acquis par les expériences suivantes:

1. Un suc extrait de feuilles fraîches est divisé en deux parties: l'une est chauffée pendant $\frac{1}{2}$ heure à l'ébullition pour tuer la peroxydase, l'autre n'est pas chauffée; cette dernière prend bien vite une couleur brune plus foncée que la solution chauffée.

2. En divisant encore en deux parties la solution chauffée et en ajoutant à l'une la peroxydase extraite du thé, le liquide prend bientôt une couleur brune, tandis que celui où l'on n'a pas ajouté d'enzyme reste moins fortement coloré.

Ces réactions, parfois peu visibles, car les peroxydes peuvent être très peu abondants et très inconstants dans les conditions de l'expérience, deviennent très nettes si l'on remédie à ce manque de peroxydes en ajoutant un peu de $H_2 O_2$.

De même, en ajoutant à des feuilles de thé en voie de fermentation un peu de $H_2 O_2$, en augmentant donc la quantité de peroxyde, en donnant par conséquent davantage d'aliment à la peroxydase, la couleur du thé ainsi traité devenait plus accentuée que celle du thé témoin, non traité.

Le ferment du thé agit de la même manière pour oxyder le pyrogallol ou l'acide gallique, dont les solutions deviennent très rapidement brunes par adjonction d'un peu d'enzyme;

toutefois, il n'en est pas de même avec l'acide tannique; celui-ci donne avec le ferment un précipité blanc, mais le liquide ne prend pas de coloration brune.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons admettre, d'une façon générale que, dans la plante, la peroxydase a pour fonction d'oxyder les substances tanniques ou d'autres combinaisons facilement oxydables, ou du moins d'activer leur oxydation, et on comprendra que cette action se continue dans les feuilles mortes en voie de fermentation, la peroxydase n'étant point tuée. Mais cela ne veut pas dire que la fermentation du thé soit exclusivement provoquée par la peroxydase, car ce phénomène ne consiste point seulement en une oxydation du tanin. La couleur brune que prennent les feuilles n'est pas un signe que la fermentation a eu normalement lieu, puisque toute une série d'autres caractères, comme l'odeur et le goût doivent entrer en ligne de compte, et c'est ce phénomène complexe qu'il s'agira d'élucider.

En résumé, si nous appliquons la théorie de Bach¹⁾ sur les oxydations, nous pouvons nous expliquer comme suit la manière dont fonctionne la peroxydase: par l'oxydation lente à l'air des tanins et autres substances oxydables contenues dans la feuille, il se forme d'abord des peroxydes qui, en présence de la peroxydase, cèdent de l'oxygène actif qui oxyde de nouvelles quantités de tanin.

III. CONCLUSIONS.

De ces essais préliminaires, consistant plutôt en une orientation dans les méthodes à suivre, nous ne pouvons pas encore tirer d'importantes conclusions ni théoriques ni pratiques, et nous nous contenterons de résumer les quelques points que nous avons cru devoir mettre en lumière.

1) Bach admet que dans tous les cas d'oxydation lente (auto-oxydation), il se forme tout d'abord des peroxydes, produits intermédiaires entre les produits initiaux et finaux de l'oxydation. (Voir les publications de cet auteur, entre autres dans les Comptes Rendus de 1894, P. 286, et de 1897, P. 951, etc. — Voir aussi à ce sujet les travaux d'Engler et de ses collaborateurs, dans les Berichte d. d. chem. Ges., 1897 à 1904, etc.)

Il en est un sur lequel nous nous sommes arrêtés à plusieurs reprises et qui concerne *la nature* des enzymes et plus spécialement *de l'oxydase*. Nous avons rappelé que Chodat et Bach ont démontré que ce n'est pas une substance simple, mais un composé d'une peroxydase β et d'un peroxyde (l'oxygénase).

En ce qui concerne la plante de thé, nous croyons pouvoir aller plus loin encore que ces auteurs, et nous émettons la supposition que la peroxydase, substance constante à action catalysatrice bien nette, existe dans toutes les parties de la plante, tandis qu'il ne s'y trouverait pas d'oxydase au sens propre du terme, c'est-à-dire à l'état de substance stable et constante; mais comme, dans la plante, il peut se trouver des peroxydes, produits intermédiaires de toute oxydation, et par conséquent fonction de tout phénomène vital, ces peroxydes, qu'on peut mettre en évidence par la réaction au iodure amidonné, donneront, en présence de la peroxydase constante, la réaction dite d'oxydase. Ceci n'est, il est vrai, qu'une hypothèse, mais l'observation que nous avons faites sur l'inconstance de la réaction d'oxydase, sur son allure limitée, etc., nous conduisent à croire que cette hypothèse se trouvera vérifiée par de nouvelles recherches.

Et même, comme les quelques observations que nous avons faites sur d'autres plantes ont concordé souvent assez exactement avec celles faites sur le thé, comme d'autre part bien des auteurs ont insisté sur l'inconstance (ou l'instabilité) des oxydases, nous sommes presque en droit de nous demander si l'avenir ne démontrera pas que notre théorie est peut-être plus générale qu'on ne pourrait le supposer au premier abord.

Nous ne voudrions pourtant pas conclure dès maintenant qu'il en soit toujours ainsi; nous voulons très bien admettre qu'il existe des „oxydases”; si par exemple on a réussi à séparer dans un extrait, par précipitation fractionnée, d'une part une peroxydase, d'autre part une oxydase et que, dans cette oxydase, on ait pu isoler, comme Chodat et Bach l'ont décrit, une oxygénase (peroxyde) et une peroxydase β , laquelle est différente de la première, si on a démontré, comme on l'a

fait pour la tyrosinase, que la peroxydase β est spécifique pour l'oxygénase à laquelle elle se trouve réunie, si encore l'oxygénase et la peroxydase sont dans un rapport constant, si les caractères de l'oxydase sont stables, si enfin la peroxydase et la peroxydase β sont nettement distinctes l'une de l'autre par un ensemble de caractères, il va bien sans dire qu'on sera alors en présence d'une vraie oxydase, mais tel n'a pas été le cas dans le thé et dans les autres plantes qui jusqu'ici ont retenu notre attention.

On pourrait dire que nous discutons sur des mots, et qu'il importe peu que le groupement peroxydase + peroxyde (oxygénase) soit constant ou non; son nom „oxydase” étant commode, il conviendrait de le lui conserver; nous ne sommes point de cet avis, car cela étant admis, il faudrait alors donner le nom d'oxydase à tout groupement peroxydase + peroxyde, quel qu'il soit, et aussi bien si le peroxyde est H_2O_2 ou tout autre peroxyde qui n'est pas de l'oxygénase; personne pourtant ne songe à semblable extension de ce terme, et nous pensons qu'il ne convient pas de conserver, sous prétexte de commodité, un mot qui se rapporte à une notion non nettement définie.

Si l'on admet notre conception: à savoir que les peroxydases seules sont constantes, et que la réaction d'oxydase n'apparaît que si, en présence de ce ferment, il se trouve un peroxyde, on pourra s'expliquer facilement l'inconstance des „oxydases” qui a frappé plusieurs auteurs: les oxydations lentes, qui passent toujours par un stade peroxyde, ne donneront en présence de la peroxydase une „réaction d'oxydase” que si on peut saisir un moment où ces peroxydes, en général peu stables, peuvent prendre part à la réaction.

De l'ensemble des faits exposés ci-dessus, pouvons-nous dès maintenant tirer une conclusion en ce qui concerne la fermentation du thé, et pouvons-nous dire que l'enzyme joue le rôle principal, ou même un rôle quelconque dans ce phénomène? Nous ne saurions l'affirmer pour le moment; les essais effectués avec les feuilles n'ont pas encore donné de résultats définitifs; la couleur brune de la feuille est-elle provoquée par

l'action de la peroxydase, ou bien aurait-elle lieu tout aussi bien et tout aussi vite sans l'enzyme? ce point n'est pas encore élucidé; nous avons bien donné quelques indications sur l'action de la peroxydase pour activer l'oxydation de certaines substances tanniques; mais, même s'il était démontré que l'adjonction de peroxydase (éventuellement accompagnée de H_2O_2) active la fermentation, cela ne signifierait pas encore que ce procédé soit à recommander, car il n'est pas encore prouvé que, dans tous les cas, la fermentation est d'autant plus favorable qu'elle est plus rapide.

Quant à la saveur, à l'odeur, etc., nous n'avons pas davantage pu définir jusqu'à présent si l'enzyme a une influence sur leur développement, et si, à l'action éventuelle des peroxydases de la feuille, des peroxydases excrétées par des levures viendraient ajouter leur action.

Nous avons déjà dit qu'on a admis *a priori* et sans démonstration que l'oxydase joue un rôle dans la fermentation du thé. On a dit: cette fermentation étant une oxydation, comme il existe dans la feuille des ferments oxydants, ceux-ci *doivent donc* activer la fermentation ou la provoquer; et l'on est parti de ces prémisses non scientifiquement établies pour arriver à des conclusions qui ne le sont par conséquent pas davantage. Les oxydases, nous l'avons vu, doivent être exclues pour le moment de la discussion; quant aux peroxydases, elle ne doivent pas être considérées sans preuve comme les agents de la fermentation; il nous semblera bien plus logique d'admettre que ces ferments jouent un rôle *ante mortem* sur les peroxydes toujours formés dans la plante vivante au cours de la respiration, plutôt que d'accepter que la plante ait préparé ces substances pour remplir une fonction *post mortem* dans le phénomène de la préparation du thé.

La présence d'une abondante peroxydase dans les racines, la semence, les organes en voie de croissance, parle en faveur de cette opinion que le ferment joue un rôle actif et principal dans la plante et notamment dans les parties de la plante qui sont en état de vie intense.

On doit bien remarquer cependant que, si la présence de peroxydase dans la feuille n'implique pas *ipso facto* un rôle de cette peroxydase dans la fermentation du thé, nous n'entendons pas dire que la possibilité d'une semblable action doit être exclue; bien au contraire, nous voulons très bien admettre que, les peroxydases étant présentes, elles continuent après la mort de la plante leur action jusqu'au moment où elles-mêmes sont tuées; mais les quelques expériences exposées ci-dessus nous empêchent d'accepter que ces ferments, existant en petite quantité dans la feuille fraîche et vivante, puissent augmenter plus tard au cours du flétrissage et de la fermentation.

On le voit, avant de tirer des conclusions quant au rôle que peuvent jouer ces ferments dans la préparation du thé, il faudra être tout aussi prudent que nous l'avons été à propos du rôle éventuel des levures, et attendre que des expériences définitives soient intervenues; toute une foule de problèmes se posent, qui sont loin d'être résolus; mais dans un sujet aussi complexe, on est obligé d'avancer très lentement, de donner les hypothèses pour ce qu'elles sont, et de ne considérer comme définitivement acquis que les faits absolument démontrés, en se gardant de toute conclusion prématurée.

MORPHOLOGISCH-PHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN BLÜTEN VON COFFEA-ARTEN.

VON

DR. F. C. VON FABER.

EINLEITUNG.

Vorliegende Arbeit hat die Bestimmung, eine Lücke in unseren Kenntnissen von der Physiologie der Fortpflanzung der Kaffeepflanze auszufüllen.

Bei Betrachtung der Litteratur erscheint es verwunderlich, wie wenig wir über wichtige Lebensprozesse und besonders über die Fortpflanzung dieser Jahrhunderte alten Kulturpflanze im Klaren sind. Für die Kaffeepflanze existieren auf diesem Gebiete nur kleine, zum Teil sehr unvollständige Arbeiten, die sich übrigens meist mit morphologischen Daten beschäftigen und worin die physiologische Seite der Frage eine sehr stiefmütterliche Behandlung erfährt.

Dies ist nicht allein mit der Kaffeepflanze der Fall, sondern auch mit einer Anzahl anderer wichtiger Kulturpflanzen: so z. B. ist über die Befruchtung, Bestäubung etc. vom Cacaobaum noch nichts sicheres bekannt, eine Frage, mit der ich mich seit kurzer Zeit beschäftige.

Die Notwendigkeit derartiger exakt wissenschaftlicher Untersuchungen muss jedermann einleuchten, besonders aber heutzutage, wo die Probleme der modernen Pflanzenkultur, wie

Selektion, Hybridisation etc. auch in den tropischen Ländern mehr und mehr Eingang gefunden haben.

Will man diese Züchtungsverfahren mit Erfolg in Anwendung bringen, so ist die exakte Kenntniss von der Fortpflanzung der Gewächse unbedingt erforderlich; man vermeidet dadurch, dass man im Dunkeln herumirrt und erspart sich unliebsame Überraschungen.

Hier tritt es einmal wieder klar zu Tage, dass allein die wissenschaftliche Untersuchung die Basis einer rationellen Kultur bildet.

Buitenzorg, Februar 1911.

ENTWICKELUNGSGESCHICHTE, MORPHOLOGIE UND CYTOLOGIE DER KAFFEEBLÜTE.

Methode.

Das Material, das den folgenden Untersuchungen zu Grunde liegt, stammt teils aus meinem Versuchs-, teils aus dem Kulturgarten zu Buitenzorg.

Die jüngsten Blütenknospen mussten von ihrer Krone befreit werden, bevor sie fixiert werden konnten, da sie ohne diese Manipulation dem Fixieren ein grosses Hinderniss entgegensetzen. Bei der Untersuchung älterer Blüten mussten die einzelnen Teile gesondert fixiert werden.

Die Fruchtknoten wurden vor dem Fixieren zerschnitten. In älteren Stadien, wenn sich die Früchte zu entwickeln beginnen, war eine Präparation besonders notwendig, um bei der Fixierung ein gutes Resultat zu erlangen. Hierzu wurden sie erst vorsichtig zerschnitten, von der Fruchtknotenwand so viel wie möglich befreit und zuletzt die Luft unter der Luftpumpe möglichst daraus entfernt, um der Flüssigkeit ein schnelleres Eindringen in das Gewebe zu ermöglichen.

Für das Fixieren kamen folgende Flüssigkeiten in Anwendung:

1. Flemming's Chrom-Osmium-Essigsäure (stärkere Konzentration).
2. Flemming'sche Lösung (schwache Konzentration)
3. Abs. Alkohol 600 ccm
 Chloroform 300 ccm
 Eisessig 100 ccm (CARNOY)
4. Zinkchlorid 2 gr
 Eisessig 2 ccm
 50% Alkohol 100 ccm (JUEL)

Lösung 1 und 2 ergaben gute Resultate, doch verwandte ich hauptsächlich die zweite, schwächere, da sich die durch die stärkere Lösung hervorgerufene Schwärzung der Gewebe mittels Wasserstoffsuperoxyd nicht völlig beseitigen liess. Die mit der schwächeren Lösung behandelten Präparate zeigten ausserdem bessere Kernstrukturen.

Die dritte Flüssigkeit kam in Anwendung, wenn es darauf ankam, möglichst schnell Übersichtsbilder zu erhalten.

Die vierte Lösung, die besonders für schwer durchdringliche Objekte geeignet ist, wurde zur Fixierung der älteren Fruchtknoten benutzt.

Das Auswaschen und Entwässern der Objekte erfolgte in der üblichen Weise; letzteres musste besonders vorsichtig geschehen, da leicht Schrumpfungen entstehen. Nach dem Auswaschen wurden die Objekte daher erst in Alkohol von 30% gebracht, dann in solchen von 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96%, später in absoluten Alkohol und dann durch Xylol in Paraffin von 45, 55 und schliesslich 62° C gebracht.

Zum Schneiden benutzte ich ein Mikrotom nach MINOT, welches innerhalb kurzer Zeit eine sehr grosse Menge guter Schnitte herzustellen gestattet. Die Schnittdicke war meist 10 μ ; um besondere Stadien zu studieren, wurden auch 5 μ dicke Schnitte vorgenommen.

Zur Färbung benutzte ich: 1. Flemming's Dreifarbenverfahren, 2. Eisenhämatoxylin nach Heidenhain, 3. Hämatoxylin nach Friedländer.

1. *Ontogenetische Entwicklung der Blüte.*

Die Blütenentwicklung wurde sowohl an Freihandschnitten als an Mikrotompräparaten studiert. Das Anfangstadium einer Blüte stellt, wie schon beobachtet ¹⁾, eine Warze dar, an welcher zuerst zwei seitliche und dann, decussiert zu diesen, eine vordere und hintere Anschwellung entsteht, die ersten Anlagen der Hüllblätter. Diese strecken sich in die Höhe und umschliessen einen mit Colleteren bekleideten Raum, auf dessen Boden die eigentliche Blüte als kleine Warze entsteht, (Taf. I, Fig. 1—3).

Auf dieser Warze bilden sich successiv 5 kleine Erhebungen, die Anlagen der Kelchzipfel. Ihre Entwicklung geschieht folgendermaassen: zuerst wird vorne eine kleine Warze gebildet, dann erhebt sich die zweite median an der Hinterseite, wieder eine dritte vorne und dann die beiden letzten lateral.

Die Entwicklung der Sepalen hört bald auf, sodass sie an der fertigen Blüte nur als kleine Zipfel erscheinen.

Nachdem sich die Höcker der Kelchblätter entwickelt haben, streckt sich der Blütenstiel und werden die Kronblätter als 5, mit dem Kelchhöckern alternierende Warzen angelegt. Beinah gleichzeitig mit den Warzen der Kronblättern erfolgt auch die Bildung der Antheren und zwar gleich den Kronblättern alternierend mit den Kelchblättern. (Taf. I, Fig. 4—8).

Während der Blütenstiel und die Anlagen der Blütenkrone in die Höhe wachsen, entstehen in der Mitte des Blütenvegetationspunktes die beiden hufeisenförmigen Erhebungen der beiden Fruchtblätter, eine vorne und eine hinten, welche später durch interkalares Wachstum emporgehoben werden. Anfangs ist der Blütenvegetationspunkt flach, wird aber bald dadurch hohl, weil vor der Mitte eines jeden Fruchtblattes eine grubenförmige Vertiefung, infolge eines gesteigerten Wachstums der Mittelregion des Blütenvegetationspunktes, entsteht.

Der Griffel entsteht dadurch, dass die oben verwachsenen

1) Vergl. FROEHNER — Die Gattung *Coffea* und ihre Arten. — Engler's Botanische Jahrbücher. 1898, S. 238.

Fruchtblätter in die Höhe geschoben werden; eine nachträgliche Spaltung führt zur Narbenbildung.

In diesem Stadium hat der Kelch sein Wachstum beendet, während die Kronblätter am Grunde mit einander verwachsen, um als Röhre, mit den inzwischen entwickelten kurzen Filamenten, gemeinsam in die Höhe zu streben; gleichzeitig hiermit entsteht zwischen Blüten- und Fruchtblättern der drüsenbesetzte Discus als ein dicker Wulst.

2. *Das Gynaecium.*

a. Anatomie des Fruchtknotens und der Frucht mit Ausnahme der Samenanlagen.

Das Fruchtknotengewebe, anfangs ziemlich gleichförmig, bekommt mit der Reife der Geschlechtsorgane und besonders mit der Reife der Samen einen complizierteren Bau.

Querschnitte durch einen Fruchtknoten etwas vor oder zur Zeit der Reife der Geschlechtsorgane zeigen unterhalb des Griffelansatzes das sogenannte leitende Gewebe, in dem die Pollenschläuche aus dem Griffelgewebe zu den Samenanlagen gelangen ¹⁾.

Zur Zeit der Reife der Geschlechtsorgane bietet ein Querschnitt des Fruchtknotens das folgende Bild:

Das ziemlich gleichförmige Gewebe wird nach aussen von einer einzelligen Epidermis begrenzt. Gegen das Fruchtfach hin findet sich ebenfalls eine engzelligere Schicht vor. Das übrige Gewebe besteht aus ziemlich dickwandigem Parenchym, in welchem in Querschnitten ein innerer und ein äusserer Kreis von Gefässbündeln hervortreten. Diejenigen des inneren Kreises sind grösser als die des äusseren und endigen im Gewebe des Discus. Diejenigen des äusseren Kreises sind kleiner und gehen in die Kronblätter über.

Im Gewebe der Fruchtknotenscheidewand, die aus kleineren Zellen als das übrige Fruchtknotengewebe zusammengesetzt ist, verläuft ein Gefässbündel das im Funiculus der Samenanlagen

1) Vergleiche hierfür: Beschreibung des Griffels.

je einen Ast abgiebt. Im Parenchym des Fruchtknotens finden sich zahlreiche Zellen mit Calciumoxalat-kristallsand.

Nach der Befruchtung ändert sich bald das Fruchtknotengewebe, indem eine deutlichere Sonderung des Endocarps hervortritt. Dieses differenziert sich in drei Schichten. Innerhalb des inneren Gefässbündelkreises ist die erste Schicht daran kenntlich das ihre Elemente sich anfangen radial zu strecken; auf diese nur einreihige Schicht folgt nach innen eine aus mehreren Reihen bestehende Schicht kleinerer und dann eine ebenfalls mehrreihige Schicht tangential gestreckter faserförmiger Zellen.

Beim Weiterwachsen der Frucht fallen diese drei Schichten deutlicher ins Auge; hat die Frucht z. B. einen Durchmesser von 10 mm, so sind die Zellen der ersten Schicht stark pallissadenartig gestreckt, die zweite Schicht ist sklerotisch geworden, indem ihre Elemente sich stark verholzt haben, während sich auch die dritte Schicht etwas verdickt hat. Zur Zeit der Frucht reife ist der anatomische Bau etwa folgender: das Parenchymgewebe ist dickwandiger geworden und enthält Kristalle; der äussere Gefässbündelkreis tritt deutlich hervor. Hierauf folgt nach innen zu eine Schicht, deren Zellen stark zusammengedrückt sind und zwischen welcher der innere Gefässbündelkreis zu sehen ist. Weiter nach innen kommt dann die Pallissadenschicht, deren Zellen stark verschleimte Membranen aufweisen.

Die sklerotische Schicht mit stark verholzten Zellmembranen bildet die sogenannte Pergamenthülle. Die letzte Schicht des Endocarps ist braun gefärbt und meist obliteriert.

Die Gefässbündel des Fruchtknotens bestehen aus Ring-, Spiral- und getüpfelten Gefässen und werden von Bast- und kurzen sklerotischen Fasern begleitet.

b. Die Samenanlagen.

Die Entwicklung der anatropen Samenanlagen geschieht folgendermaassen:

Die Zellen der Placenta unterscheiden sich von denen der Fruchtknotenscheidewand durch ihre stärkere Färbung.

Zur Zeit der Samenknospenentwicklung wölben sich eine Anzahl Zellen der Placenta in das Fruchtfach vor und bilden so den Anfang der Samenknospe. Längsschnitte durch in diesem Entwicklungszustand befindliche Fruchtknoten zeigen, dass durch eine lebhafte Zellteilung des aus der Placenta hervorgegangenen Höckers diese bald fast den ganzen zur Verfügung stehenden Raum im Fruchtfach einnimmt, sodass nur ein schmaler Spalt zwischen Samenanlage und Fruchtknotenwand übrig bleibt. (Taf. II, Fig. 9).

Es sei hier kurz betont, dass zu Anfang der Samenknospenbildung unterhalb dieses Organs aus der Placenta die Entstehung eines neuen sichtbar ist. Dieses Organ, das ich unten eingehend besprechen werde, ist der Obturator.

Verfolgen wir nun die weitere Entwicklung der Samenknospe in Längsschnitten, so sehen wir, dass diese erst ein wenig in die Höhe wächst, also nach dem oberen Teil der Fruchtknotenwand hin. Hier angekommen, ist sie gezwungen nach unten umzubiegen. Ungefähr zu dieser Zeit beginnt auch die Bildung des einzigen Integuments (Taf. II, Fig. 10).

In Längsschnitten gesehen wölben sich oberhalb und unterhalb des Nucellus eine Anzahl Zellen nach aussen und bilden hierdurch den ersten Anfang des Integuments, welches von Anfang an mehrschichtig ist und sich im Laufe der weiteren Entwicklung durch lebhafte Zellteilung sehr verdickt. Während sich der Nucellus nach unten umbiegt überholt ihn das Integument, wächst über ihn hinaus, (Taf. III, Fig. 11) nur einen kleinen Kanal, die Mikropyle, frei lassend.

Längsschnitte durch fertige Samenanlagen zeigen, dass der Nucellus im Verhältniss zum Integument verschwindend klein ist und in befruchtungsfähigen Samenknospen fast ganz durch den Embryosack eingenommen wird (Taf. II, Fig. 12). In nicht ganz median getroffenen Schnitten der Samenknospe erscheint diese daher nackt. Hierdurch mag es auch gekommen sein, dass SCHLEIDEN¹⁾ die Samenanlagen der Rubiaceen als anatrop und

1) Einige Blicke auf die Entwicklungsgeschichte des vegetabilischen Organismus bei den Phanerogamen. Wiegmann's Arch. 3, 1837, S. 289, 414.

integumentlos bezeichnet hat, haben doch viele Vertreter dieser Familie, wie LLOYD ¹⁾ nachgewiesen, tatsächlich nur ein dickes nicht sofort ins Auge fallendes Integument. Schon WARMING ²⁾ betont, dass es sehr begreiflich ist, wie das einzige dicke Integument mit der dünnen und schwer erkennbaren Mikropyle leicht übersehen werden kann.

Die allmähliche Entwicklung der Samenanlage in Querschnitte betrachtet gestaltet sich folgendermaassen:

Aus der Placenta entsteht die Samenanlage als ein kleiner Höcker der sich im Fruchtfach hervorwölbt und im Anfang erst ein wenig nach einer Seite hin wächst. In diesem Stadium ist auch der Obturator zu sehen wie er die junge Samenanlage umgiebt.

Diese biegt sich bei der Weiterentwicklung bald nach der entgegengesetzten Seite des Fruchtfaches hin und verdrängt allmählich das Obturatorgewebe, sodass letzteres in älteren Stadien nur noch als dünne Lamelle sichtbar ist. Wenn der Embryosack schon fertig ausgebildet und das Ei befruchtungsfähig ist, sind die jungen Samenknospen stark gewachsen und füllen beinahe das ganze Fruchtfach aus. Nach der Befruchtung ändert sich die Gestalt der Samenanlage bald. Die starke Vermehrung des Endosperms ist die Ursache dass der kurze Funiculus beiseite gedrückt wird; der heranwachsende Same zeigt im Querschnitt eine keulenförmige Gestalt. Hat die Frucht ungefähr einen Durchmesser von etwa 10 mm erreicht, so erfolgt eine zweite Umkrümmung des Samens, indem sich das am stärksten wachsende Ende des Samens am entgegengesetzten Ende der Ansatzstelle des Funiculus umkrümmt und zwischen Scheidewand und Funiculus einschiebt. Hierdurch entsteht die eigenartige Gestalt des Samens im Querschnitt gesehen, worauf ich später noch zurückkomme.

Diese eigentümliche Krümmung der Samenknospe, die in Querschnitten besonders deutlich ins Auge fällt, macht die

1) The comparative embryologie of the Rubiaceae. Mem. of the Torrey botan. Club, Vol. 8, No. 4, Part 4, 1899.

2) De Povule. Ann. Sc. Nat. Bot. 4 1878, S. 177.

Deutung der Lage von Funiculus und Nucellus wohl etwas schwierig. Da der Obturator durch die eigentümliche Lage der Samenknospe beeinflusst wird, komme ich bei der eingehenden Besprechung desselben noch einmal hierauf zurück.

Von der Placenta aus läuft ein Gefäßbündel in den Funiculus und Nucellus und endet dort in der Chalaza. Dieses Bündel entsendet ebenfalls ein solches in die Raphe, welches wieder für sich eine Anzahl, im rechten Winkel nach links und rechts sich abzweigende, zarte, meist nur zwei Gefäße führende Nebenbündel bildet, die im Integument ein Stückchen weit zu sehen sind. Das Raphebündel tritt deutlich hervor wenn man Samen in Wasser quillt, die Samenschale mit der Nadel aus der tiefen Furche herauslöst und die lösende Haut in Chloralhydrat legt. Man sieht dann, dass es aus ziemlich zahlreichen, sehr zarten Spiralgefäßen besteht, die eine Weite von 7—10 μ besitzen. Die Nebenbündel, die vom Raphebündel nach links und rechts in die Samenschale abzweigen, gehen nicht auf die konvexe Seite der Same über, sodass diese Seite gänzlich bündelfrei ist.

Gewöhnlich entwickelt sich in jedem Fruchtfach nur eine Samenknospe. Bei polyembryonischen Kaffee Früchten bilden sich aber zwei oder drei Samenknospen in jedem Fruchtfach.¹⁾ Häufig kommt es aber auch vor, dass sich in der zweifächerigen Frucht nur eine Samenknospe entwickelt und die andere bald verkümmert. Erstere schiebt dann beim Heranwachsen zum Samen die Scheidewand bei Seite und füllt die ganze Fruchthöhle aus. Der Same ist dann im Querschnitt nicht plankonvex sondern rund (Perlkaffee).

Die Krümmung der Samenknospe ist meist in den beiden Fruchtfächern nicht gleichsinnig. Es kommt aber auch häufig vor, dass dies der Fall ist.

Über das Zustandekommen der eigentümlichen abgeplatteten Gestalt, wie wir sie in der Querschnittsbilder sehen, möchte ich hier noch einiges mitteilen. MARCHAND glaubte diese Form

1) Vergl. hierfür Kapitel „Polyembryonie“.

dem Vorhandensein des Obturators zuschreiben zu müssen. Ich bin dagegen zu der Auffassung gelangt, dass die abgeplattete Gestalt weniger mit dem Obturator als mit dem Wachstum des Fruchtfaches zu tun hat.

Dieses hat im Querschnitt gesehen zuerst fast kreisrunde Gestalt. Später wächst es jedoch in tangentialer Richtung aus und wird dadurch etwas radial abgeplattet. Um möglichst viel Raum zu sparen, wendet die Samenknospe sich zunächst nach der einen Seite des Samenfaches und, wenn diese Seite gefüllt ist, biegt sie sich nach der anderen Seite hin. Entsprechend der abgeplatteten Gestalt des Fruchtfaches nimmt auch die Samenknospe diese Form an. Wenn das Fruchtfach seine definitive Gestalt und Grösse erreicht hat, muss die Samenanlage, um weiter Platz zu finden, sich nochmals umkrümmen.

c. Der Obturator.

Das Vorhandensein eines Obturators bei *Coffea arabica* wurde zuerst von MARCHAND ¹⁾ festgestellt. Dieses Gewebe das bei der Befruchtung eine wichtige Rolle spielt, habe ich auch bei den anderen Arten dieser Gattung gefunden. Übrigens scheint das Vorhandensein eines Obturators bei den Rubiaceen nicht selten zu sein.

LLOYD fand es bei *Diodia Virginiana* und *Diodia teres* und auch bei *Richardsonia pilosa* und nennt es „Strophiole“. Ich habe ausser *Coffea* auch noch nahe verwandte Gattungen, u. a. *Pareta* speciell daraufhin untersucht und gefunden, dass auch hier ein Obturator vorhanden ist.

Auf den Obturator als leitendes Organ für die Pollenschläuche und die physiologische Bedeutung dieses Gewebes komme ich später bei der Besprechung der Befruchtung noch zurück. Hier sei zunächst nur die Entwicklung und Anatomie dieses eigenartigen Gewebes kurz geschildert.

In Längsschnitten durch ganz junge Fruchtknoten sieht man unterhalb der Anheftungsstelle der Samenanlage an die Placenta

1) Recherches organographiques et organogéniques sur le *Coffea arabica* L. — Paris 1864. S. 30.

ein ebenfalls aus der Placenta hervorgegangenes Gewebe in das Fruchtfach vorspringen (Taf. II. Fig. 10). Dieses Organ ist der Obturator, dessen Entstehung ungefähr gleichzeitig oder etwas später als die der Samenanlage erfolgt. Gewöhnlich ist der Obturator schon gut sichtbar wenn das Integument sich aus dem Dermatogen der Samenanlage differenziert.

Die Entstehung des Obturators aus dem Placentagewebe möchte ich hier ganz besonders betonen. Seine Zellen sind von Anfang an an dieser Stelle mit denen der Samenanlage verwachsen. In jungen Stadien sind die Elemente des Obturators von denen der Samenknope noch nicht zu unterscheiden.

Bei der Weiterentwicklung der Samenknope, etwa zur Zeit wenn diese nach unten umbiegt und das Integument anfängt sich über dem Nucellus zu schliessen, entsteht ein eigentlicher Funiculus dadurch, dass sich die ursprüngliche Ansatzstelle der Samenknope an der Placenta in das Fruchtfach vorstreckt.

Die Folge dieser Streckung des Funiculus ist, dass der Obturator, der von Anfang an mit diesem Teil der Samenknope fest verwachsen war, mitgenommen wird. Hierdurch wird die scheinbare Entstehung des Obturators aus dem Funiculus erklärlich. In Wirklichkeit entstehen beide gleichzeitig aus der Placenta, stehen aber von Anfang an mit einander in Verbindung.

Die ursprüngliche Bildung des Obturators gleichzeitig mit der Samenknope aus dem Placentagewebe habe ich vorhin deshalb besonders betont, da LLOYD bei *Diodia teres* und *D. Virginiana* angiebt, dass der Obturator (Strophiole, LLOYD) vom Funiculus aus entsteht, obwohl seine Zeichnung (Figur 14, Tafel 12) mehr die Entstehung dieses Gewebe aus der Placenta als aus dem Funiculus illustriert. Er sagt darüber Folgendes ¹⁾: „In the Spermaceae there is in addition to the integument a second outgrowth derived from the funiculus and here called a strophiole”.

SCHWEIGER ²⁾ der die Samenentwicklung der Euphorbiaceen genauer studierte und sich besonders mit dem Obturator befasste

1) l. c. S. 59.

2) Beiträge zur Kenntniss der Samenentwicklung der Euphorbiaceen: Flora, Bd. 94, 1905. S. 339.

hebt hervor, dass dort der Obturator ein vom Funiculus unabhängiges Gewebe darstellt, indem beide unabhängig von einander entstehen. Nach der Beschreibung SCHWEIGER's scheinen bei der Gattung *Ricinus* ähnliche Verhältnisse vorzuliegen wie bei der Gattung *Coffea*, denn er sagt: „Auf späteren Stadien der Entwicklung gewinnt es den Anschein, als sei der Obturator dem Funiculus entsprungen; die Entwicklungsgeschichte beweist aber, dass dem nicht so ist. Jene Gewebezone der Placenta, aus welcher der Funiculus und selbständig darüber der Obturator entspringt, erfährt bald eine beträchtliche Streckung; der Funiculus wendet sich dann in scharfer Krümmung nach abwärts, was besonders nach dem Verlaufe des Gefässbündels beurteilt werden kann. Der Obturator liegt aber in späteren Entwicklungsstadien scheinbar dem Funiculus auf. Er ist aber nicht mit ihm verwachsen, noch weniger ist er hervorgegangen aus dem Funiculus, wie DALMER meint, etc.“

Zur Zeit der Befruchtung stellt der Obturator ein glockenförmiges Gebilde dar, welches die Samenanlagen bis zur Mitte umhüllt und meist ringsum mit dem Integument fest verwachsen ist; in diesem Stadium liegt die Mikropyle dem Obturator auf, wird aber nicht ganz durch ihn verschlossen (Taf. IV, Fig. 17, 18).

Ein Gefässbündel besitzt der Obturator nicht. Ich betone dies, weil LLOYD bei *Diodia Virginiana* von einem „vascular tissue“ in dem Obturator spricht. Er sagt: „In the first place, the supply of vascular tissue to the ovule is confined to the strophiole. A single strand of the same passes through the funicule and upon reaching the strophiole divides, sending one branch, the chief one, to the chalazal region of the strophiole, the other toward the micropylar region“.

Während die Zellen des Obturators anfänglich von denjenigen der Samenknospe nicht zu unterscheiden sind, (sie sind isodiametrisch, enthalten viel Plasma und einen grossen Kern) verlieren sie später ihre bisherige Gestalt und wachsen zu langen haarförmigen Gebilden aus, was besonders zur Zeit der Befruchtung und unterhalb der Mikropyle der Fall ist. Es sei noch bemerkt, dass diese Zellen sich besonders mit Hämatoxylin stark

tingieren. Die Zellmembranen sind dünn und enthalten anscheinend Schleimsubstanzen, wenigstens deutet die Reaktion mit Rutheniumrot darauf hin.

Nach der Befruchtung verschwindet der Obturator allmählich.

3. *Cytologische Untersuchung des Gynaeceums.*

a. Das Archespor.

Das weibliche Archespor ist schon in sehr jungen Entwicklungsstadien der Samenanlage sichtbar.

Etwa in der Mitte der jungen Samenanlage, 6 Zellschichten unterhalb des Dermatogens, fallen eine Anzahl von Zellen durch ihre Grösse und intensive Färbung ihrer Kerne auf. Die Anzahl dieser Zellen wechselt sehr, einmal fand ich deren sechs, meist aber zwei oder drei (Taf. II, Fig. 9 und Taf. III, Fig. 13).

Die Kerne dieses Gewebecomplexes zeichnen sich von den anderen sie umgebenden nicht allein durch ihre Grösse, sondern auch dadurch aus, das ihr Chromatingerüst ein viel lockereres ist.

Ähnliche Verhältnisse fand LLOYD bei dem Studium anderer Rubiaceen, so z. B. bei *Diodia Virginiana*, jedoch ist bei den Vertretern dieser Gattung der Gewebecomplex direct unterhalb dem Dermatogen gelegen, was bei *Coffea* nicht der Fall ist, wie oben betont wurde. Frühzeitig unterscheidet sich die mittlere Zelle des Complexes von den anderen Zellen nicht allein durch ihre Grösse, sondern auch durch Veränderungen in dem Kerngerüst, die darauf hindeuten, dass Teilungen des Kerns bevorstehen. Die anderen sich nicht teilenden Zellen haben ein deutlich ruhendes Chromatin und werden allmählich von der zur Teilung sich anschickenden Zelle verdrängt. Niemals habe ich beobachtet, dass eine von ihnen dieselben Veränderungen durchmacht wie die mittlere Zelle, weshalb ich nicht glaube, dass sie als überzählige Archesporzellen aufzufassen sind. Auch LLOYD gibt für *Diodia* an, dass die die Archesporzelle umgebenden Zellen sich nicht weiter zu Embryosäcken entwickeln können: „In the form here being described, the archesporium, however, contains only one functional megaspore mother-cell (fig. 3) sur-

rounded by a number — about a half dozen — of cells of similar character, but reduced in size, and as their later history shows, possessing usually no ability to divide or to act as embryosac fundaments”.

Die Bildung des Embryosacks aus dem Archospor findet, wie meine Untersuchungen gezeigt haben, bei der Vertretern der Gattung *Coffea* auf eine etwas andere Weise statt als dies gewöhnlich der Fall ist. Bei der Tetradenteilung werden nämlich Scheidewände nicht gebildet. Hierbei muss aber ausdrücklich betont werden, dass eine eigentliche Zellbildung wohl eingetreten ist, da sich trotz der fehlenden Wände die vier Kerne mit Plasma umgeben. Das Ausbleiben der Wandbildung bei der Tetradenteilung ist nicht so selten wie man anfangs wohl glauben könnte, und steht den Fällen mit normal auftretenden Wänden entwicklungsgeschichtlich sehr nahe. So berichtet SMITH¹⁾, dass in den Tetraden von *Eichhornia crassipes* Wände in den meisten Fällen nicht auftreten, und CANNON²⁾ giebt für *Avena fatua* etwas ähnliches an. Die Figuren dieser Arbeiten zeigen deutlich dass eine Zellbildung eingetreten ist und dass die Kerne sich mit abgegrenztem Plasma umgeben haben.

Das bei anderen Rubiaceen eine etwas abweichende Tetradenteilung schon beobachtet wurde, beweist die Angabe von LLOYD³⁾ für *Crucianella*, wovon er sagt, dass „megaspores and their derivatives remain in a syncytial condition”.

Ich glaube, dass diejenigen Fälle in denen bei der Tetradenteilung eine Wandbildung nicht mehr eintritt, und diejenigen bei denen der Embryosack direkt aus der Archosporzelle hervorgeht entwicklungsgeschichtlich zusammenhängen. Bereits LAGERBERG⁴⁾ hat auf diesen Umstand aufmerksam gemacht.

1) A contribution to the livehistory of the Pontederiaceae. — Bot. Gaz. 25.

2) A morphological study of the flower and embryo of the wild oat, *Avena fatua* L. — Proceed. Calif. Acad. Sc., Ser. 3, Bot. 1.

3) L. c. S. 83.

4) Studien über die Entwicklungsgeschichte etc. von *Adoxa Moschatellina* L. — Kungl. Svenska Vetenskapsakad. Handlingar, Bd. 44., N^o. 44, 1909.

b. Bildung des Embryosacks.

Wie oben schon kurz angegeben teilt sich die Embryosackmutterzelle in vier nackte Tochterzellen, wovon die obere zum Embryosack wird. Diese bleibt allein übrig, da die unteren Tochterzellen zu Grunde gehen. Kurz nach der Bildung der vier nackten Tochterzellen sieht man, dass das Kerngerüst der drei unteren in unregelmässige Klumpen zerfällt und von der inzwischen stark heranwachsenden oberen Zelle verdrängt wird, sodass von diesen unteren Zellen schliesslich nur noch kleine Reste übrig bleiben (Taf. IV, Fig. 19). Das Wachstum des Embryosacks in die Länge ist so stark, dass er die unter ihm liegenden Periblemzellen der Samenknospe verdrängt und zur Zeit der Integumentschliessung direkt oberhalb der Mikropyle zu liegen kommt, von der er nur durch das Dermatogen getrennt wird.

Eine weitere Entwicklung des Embryosacks findet nun nicht mehr statt, wenn eine Bestäubung unterbleibt; es tritt also in der Entwicklung eine Ruheperiode ein, die nur durch die Bestäubung ausgelöst wird. Findet letztere statt, so folgen die verschiedenen Stadien der Embryosackentwicklung rasch aufeinander.

Der Umstand dass der Fruchtknoten nur zwei Samenknospen enthält, gestaltet das genaue Studium der cytologischen Bilder sehr mühsam und besonders zeitraubend, da sehr viele Fruchtknoten untersucht werden müssen, will man die aufeinanderfolgenden Stadien studieren. Im Nachstehenden folgt eine kurze Schilderung der verschiedenen cytologischen Bilder bis zur Bildung des Embryosacks.

c. Präsynapsis, Synapsis, Reduktionsteilung, Tetradenbildung.

Diese Phasen wurden in der Embryosackmutterzelle studiert. Im präsynaptischen Stadium hat der Kern dieser Zelle eine netzartige Struktur und weicht in dieser Beziehung wenig von den somatischen Kernen ab. In dieser Struktur ist es nicht möglich, Linin und Chromatin von einander zu unterscheiden.

Während anfangs die Fäden unregelmässig, manchmal etwas kantig aussehen, werden sie, wenn sie sich verdicken, glätter und weisen an verschiedenen Stellen dicke, stärker färbbare Knoten auf, welche sich in manchen Kernen deutlich und leicht zählen lassen. Ihre Zahl stimmt mit der der somatischen Chromosomen überein und beträgt 16. Diese Chromatinansammlungen stellen jedenfalls Prochromosome dar, bei denen sich allmählich eine paarige Anordnung herausbildet. Die Prochromosomenpaare nähern sich einander, wodurch ein Faden gebildet wird, dessen Schlingen parallel verlaufen, was besonders später, im synaptischen Stadium, deutlicher sichtbar ist.

Kurz nachdem sich aus den Prochromosomen ein Fadensystem herausgebildet hat, zieht dieses sich an einer Stelle des Kernes zurück, womit das synaptische Stadium erreicht ist. Erscheint im Anfang dieses Stadiums die Parallelität des Fadensystems recht deutlich, so ändert sich dieses Bild sehr schnell, indem sich der Faden sehr stark zusammenballt und stärker tingiert, sodass von einer parallelen Struktur nicht mehr die Rede sein kann. Diese im Synapsisstadium stark kontrahierte dunkelfärbbare Masse ist eine auch in den Pollenmutterzellen auftretende Erscheinung. Ähnliche Bilder wurden schon bei einigen anderen Pflanzen beobachtet und beschrieben, so z. B. von MOTTIER ¹⁾ bei *Podophyllum* und *Lilium* und von CARDIFF ²⁾ bei *Acer*, *Salomonina* und *Gingko*.

Was das Vorhandensein von Nucleolen betrifft, sei hier bemerkt, dass in der präsynaptischen Phase mehrere von ihnen, etwa 2 bis 3, zu erkennen sind, während sich in den synaptischen Stadien meist nur ein Nucleolus, selten 2, finden; sie liegen dann frei im Kernlumen.

Der Häufigkeit wegen, womit das stark kontrahierte Synapsisstadium in den Präparaten gefunden wurde, bin ich geneigt anzunehmen, dass dieses Stadium eine Art Ruheperiode in der

1) The development of the heterotypic chromosomes in pollen-mothercells. — Ann. of Bot. 21, 1907, S. 319.

2) A study of synapsis and reduction. — Bull. Tor. Bot. Cl., 33, 1906, Fig. 15, Taf. XII; Fig. 45, Taf. XIII; Fig. 58, Taf. XV.

Entwicklungsgeschichte des Kernes darstellt, wie auch bereits LAGERBERG und MOTTIER, ersterer bei *Adoxa*, letzterer bei *Podophyllum* dies beobachtet haben; MOTTIER nennt hier die Synapsis „probably the longest pause in the entire mitotic process“.

Die postsynaptischen Phasen werden dadurch eingeleitet, dass sich der kontrahierte Fadenknäuel allmählich lockert und die Schlingen des Chromatinfadens wieder deutlich sichtbar werden. Ob letzterer kontinuierlich oder unterbrochen ist, konnte ich mit Sicherheit nicht feststellen, da sich der Faden nicht in seiner ganzen Länge verfolgen liess. LAGERBERG teilt in seiner Arbeit über *Adoxa* mit, dass ein ununterbrochenes Spirem vorhanden ist, was bekanntlich in allgemeinen von einigen Forschern in Abrede gestellt wird. GRÉGOIRE ¹⁾ und WYGAERTS haben zuerst die Existenz eines kontinuierlichen Fadens in der Prophase verneint und GRÉGOIRE möchte auch neuerdings seine Ansicht für die heterotypische Teilung geltend machen. ²⁾ Die meisten Autoren sind aber geneigt, den Knäuel als kontinuierlichen Faden anzusehen.

Der Fadenknäuel, der im postsynaptischen Stadium wieder den ganzen Kern ausfüllt, ist einheitlich gebaut, nur sind bei genauerer Betrachtung dunklere und hellere Partien zu erkennen.

Das postsynaptische Stadium, d. h. die Phasen von der stark kontrahierten Synapsis bis zum gleichmässigen Spirem, verläuft schnell. Bevor die Segmentierung des Fadens in Doppelchromosomen erfolgte, konnte in einigen Präparaten eine deutliche Kontraktion des Fadens beobachtet werden und würde dieses Stadium den „Second synapsis“ oder „Second contraction“ entsprechen. Ob letzteres, zuerst von Miss SARGENT ³⁾ beobachtetes Stadium, als eine wirkliche erneute Kontraktion des Fadens, oder als eine fortgesetzte directe Entwicklung des Spirems aufzufassen ist, wie LAGERBERG dies darstellt, habe ich nicht weiter untersucht.

Während der postsynaptischen Entwicklung wird das ganze

1) La reconstitution du noyau et la formation des chromosomes dans les cinèses somatiques. La Cellule, T. 21, 1903, S. 7.

2) L. c. La Cellule, 1904, S. 301.

3) The formation of the sexual nuclei in *Lilium Martagon*. 1. Oogenesis. — Ann. of Bot. 10, S. 460—60, Fig. 17, 18, Taf. 23.

Spirem wieder als doppelter Faden sichtbar. Bald darauf ist die Segmentation des Doppelfadens, der in 8 Stücke zerfällt, zu erkennen, entspricht also der Hälfte der Chromosomenzahl der somatischen Kerne. Gut gefärbte Präparate schienen besonders geeignet, den Vorgang der Spaltung des Doppelfadens in Doppelchromosomen zu studieren. Nach der Längsspaltung des Spiremfadens drehen sich die Hälften umeinander und zwar nur die dunkel gefärbten Partien des Fadens, während die helleren, kurzen Stellen eine Drehung nicht aufweisen; man könnte dieses Drehungsstadium als Strepsinema bezeichnen. Die hellgefärbten, kurzen Partien zwischen den dunkelgefärbten, umeinandergedrehten, sind die Stellen wo die Segmentierung des Strepsinemas einsetzt und zur Bildung der Doppelchromosomen führt. Während der Diakinese drehen sich die Doppelchromosomen etwas auseinander und verdicken sich beträchtlich.

Die Desorganisation der Nucleolen erfolgt schon vor Eintritt der Diakinese und äussert sich zuerst in einer starken Abnahme der Tinctionsfähigkeit; später, bei der Spindelbildung, zerfallen die Nucleolen in unregelmässige, allmählich verschwindende Klumpen, deren Überreste ich häufig als extranucleolare Nucleolen im Cytoplasma liegen fand.

Während der hier oben beschriebenen Veränderungen des Archesporkerns haben in der Struktur des umgebenden Cytoplasmas verschiedene Umwandlungen stattgefunden. Anfangs gleichmässig aus einem Netzwerk feiner Fäden bestehend und überall in der Zelle gleichmässig verteilt, konzentriert sich das Netzwerk während der Synapsis um den Kern. Kurz nach, oder schon während der Diakinese findet die Bildung der multipolaren Kernspindel statt, über deren Entstehung bei der heterotypischen Teilung nicht viel zu sagen ist. Die Fasern des Cytoplasmas sammeln sich zur sogenannten Filzschicht um den Kern, dessen Membran allmählich aufgelöst wird. Aus der Faserschicht um den Kern bildet sich nun die multipolare Spindel, an deren Bildung der Kern anscheinend nicht teilnimmt. Dagegen konnte festgestellt werden, dass die, aus den Nucleolen entstandenen extranucleolaren Nucleolen, die innerhalb des

Gebietes der alten Kernmembran liegen, gerade dort angesammelt sind, wo sich die Spindelfasern erstrecken; hierdurch wäre man geneigt, den Kernkörperchen eine Bedeutung bei der Bildung der Spindelfasern beizumessen. Bekanntlich hat STRASBURGER ¹⁾ die Meinung ausgesprochen, dass der Nukleolus hauptsächlich das Material zur Spindelfaserbildung liefert. Später äusserte NEMEC ²⁾ dieselbe Ansicht und auch GRÉGOIRE ³⁾ ist dieser Auffassung. Dagegen behaupteten GARDNER ⁴⁾ und WAGER ⁵⁾ dass die nukleolare Substanz besonders bei der Bildung der Chromosomen verbraucht wird. Dieser Ansicht hat sich neuerdings auch MANO ⁶⁾ angeschlossen. Ich möchte mich nach meinem Material zu urteilen der Ansicht von STRASBURGER anschliessen, denn die Nukleolen behalten ihre Grösse und Gestalt während der ganzen Diakinese hindurch bei und werden erst mit dem Eintritt der Spindelbildung ganz aufgelöst. MIYAKE ⁷⁾ stellt sich in dieser Frage vorwiegend auf die Seite von STRASBURGER, obwohl er eine Ernährung der Chromosomen durch die Nukleolen nicht für unwahrscheinlich hält. Er drückt sich dabei sehr vorsichtig aus „So kann ich sagen, dass es scheint, dass wenigstens bei der hetrotypischen Teilung ein grosser Teil der nukleolaren Substanz für die Spindelbildung verbraucht wird, wenn es auch nicht unwahrscheinlich ist, dass ein Teil derselben Substanz zur Ernährung der Chromosomen dient“.

Die multipolare Spindel geht bald in eine bipolare über und die Doppelchromosomen ordnen sich zur Kernplatte.

In diesem, als Aster bezeichneten Stadium, ist die paarige

1) Ueber Reduktionsteilung. — Sitzber. d. Kgl. Preuss Akad. d. Wiss., Physk. Math. Kl., Bd. 28, 1904, S. 587.

2) Zur Physiologie der Kern- und Zellteilung. Bot. Centrbl. Bd. LXXVIII, 1899, S. 251, und Sitzber. d. Böhm. Ges. d. Wiss., 1899, N^o. XII, S. 7.

3) Les cinéses polliniques etc. — La Cellule, T XVI, 1899, S. 297.

4) Studies on Growth and Cel Division in the root of *Vicia Faba*. Publ. of the Univ. of Pennsylv., Contrib. from the bot. Lab., Vol. I, 1901, S. 150.

5) The Nucleolus and Nuclear Division in the Root-apex of *Phaseolus*. — Ann. of Bot., Vol. XVIII, 1904, S. 29.

6) Nucleolus et Chromosomes dans le Méristème radicaire de *Solanum tuberosum* et *Phaseolus vulgaris*. — La Cellule, T. XXII, 1904 S. 57.

7) Ueber Reduktionsteilung in den Pollenmutterzellen einiger Monokotylen. — Jahrb. f. Wiss. Bot., Bd. XLII, 1906, S. 101.

Anordnung der Chromosomen deutlich sichtbar. Wenn die Teilung einsetzt ordnen sich die Doppelchromosomen senkrecht zur Spindelachse an und werden von den Zugfasern erfasst.

Bevor ich zu der Beschreibung der weiteren Teilungsphasen schreite, möchte ich noch bemerken, dass die Chromosomenpaare nicht gleich gross sind. Solche Grössenunterschiede der Chromosomen wurden auch schon bei anderen Pflanzen nachgewiesen, worüber ausführliche Litteraturangaben bei MIYAKE zu finden sind.

Wenn die Zugfasern die Chromosomen erfassen, sind diese von elliptischer Gestalt, was damit zusammenhängt, dass die beiden Hälften in ihrer Mitte an die Zugfasern geheftet sind und nach den beiden Polen gezogen werden. Bevor die Chromosomen die Polen erreichen, ist bisweilen eine Längsspaltung der Tochterchromosomen zu beobachten. Eine vollständige Spaltung aller Chromosomen tritt erst an den Polen ein, und demzufolge liegen an jedem Pole wieder 8 Doppelbildungen. Die Chromosomen sind aber hier nicht paarweise angeordnet, sondern einzeln, der Länge nach in zwei Hälften gespalten.

Haben die Chromosomen die Pole erreicht, so entstehen zwei Kerne, die eine undeutliche Wand besitzen. Die Chromosomen bleiben an der Wand sichtbar und auch ihre Spaltung kann während der Interkinese deutlich beobachtet werden. Eine wirkliche Teilung der Zelle findet nicht statt; die Spindelfasern zwischen den Chromosomengruppen werden dicker als sie sonst sind und färben sich stark mit Gentianaviolett. Gleichzeitig mit dieser Verdickung der Spindelfasern in der äquatorialen Zone geht eine allmähliche Auflösung an den Polspitzen Hand in Hand. Im Cytoplasma der stark vergrösserten Archesporzelle sind inzwischen Vakuolen aufgetreten. Ein Ruhezustand der Chromosomen in den interkinetischen Kernen tritt nicht ein, sondern sie schicken sich bald zu einer neuen Teilung an.

Während der Rückbildung der Spindelfasern an den Polen, treten im Cytoplasma zahlreiche extranukleolare Nukleolen auf, die aber bald verschwinden; hierauf werden dann die Nukleolen in den interkinetischen Kernen sichtbar.

Wenn die homöotypische Teilung beginnt, erscheinen die Chromosomen wieder deutlicher als in den interkinetischen Kernen und etwaige Anastomosen werden zurückgezogen. Die beiden Kerne haben dann einen spiremartigen Charakter, der Chromatinfaden ist locker im Kernraum verteilt. Im nächsten Stadium sind die Chromosomen paarweise und in der Archesporzelle zwei in derselben Richtung, meist parallel zur Längsachse der Zelle laufende Spindeln sichtbar, die sich von der heterotypischen nicht unterscheiden. Im Cytoplasma treten wieder eine Anzahl extranukleolare Nukleolen auf (Taf. III, Fig. 15). Die Zugfasern fassen die Chromosomen wie bei der ersten Teilung, die Hälften gehen auseinander und in jeder Spindel ziehen nach jedem Pole 8 Chromosomen. Zwischen den neuen Kernen verdicken sich wiederum die Spindelfasern. Ist die Teilung vollendet, so hat sich um die Kerne eine Membran gebildet, worauf sie in den Ruhezustand übergehen. Eine Wandbildung zwischen den Kernen findet nicht statt; die Tetradenteilung ist hiermit vollzogen (Taf. III, Fig. 16).

Das Endresultat der Tetradenteilung der Embryosackmutterzelle ist das Vorhandensein von vier nackten Zellen. Dieser Zustand dauert nicht lange, da die Tetrade bald etwas in die Länge wächst und eine Degeneration der unteren drei Zellen einsetzt. Diese Degeneration gibt sich darin kund, dass das Chromatin in unregelmässige, klumpenartige Gebilde zerfällt (Taf. IV, Fig. 19).

Nur die obere Zelle ist normal geblieben, hat sich schon den anderen gegenüber stark vergrössert und verdrängt, wie oben schon kurz angedeutet, die drei anderen. Während der Embryosack schnell an Grösse zunimmt, vermehren sich seine Vakuolen; nachdem der Embryosack die Periblemzellen bis zur Mikropyle verdrängt hat, tritt, wie oben schon erwähnt, eine Ruheperiode in der weiteren Entwicklung ein. Ich habe sehr viele Samenknospen gerade hieraufhin untersucht und bin zu der Anschauung gekommen, dass dieses Ruhestadium eine allgemeine Erscheinung bei den *Coffea*-Arten ist. Nur in wenigen Fällen entwickelt sich der Embryosack gleich weiter, meist aber wird diese Weiterentwicklung von der Bestäubung abhängig gemacht.

Da Letztere bei *Coffea liberica* schon in der Knospe autogam stattfindet, ist diese Ruheperiode nicht von allzu langer Dauer. Eine Erklärung für diese Erscheinung liesse sich vielleicht darin finden, dass die Pflanze möglichst sparsam mit dem Material wirtschaftet und eine Weiterentwicklung des Embryosacks erst dann eintreten lässt, wenn eine solche wirklich zweckmässig ist. Dass bei *Liberia-Kaffee*, wo mit der sicheren autogamen Bestäubung auch eine Befruchtung hinlänglich gesichert erscheint, diese Ruheperiode trotzdem noch existiert, dürfte nicht so verwunderlich sein, da, wie ich später noch ausführlich begründen werde, *Coffea liberica* früher noch keine sichere autogame Bestäubung hatte und die Blüte mehr auf Fremdbestäubung mittels Insekten eingerichtet war. Diese Fremdbestäubung war wahrscheinlich nicht immer gesichert, und die Sparsamkeit womit die Pflanze wirtschaftete, sehr berechtigt.

Die Stillstand in der Entwicklung des Embryosacks dürfte also ein altes Überbleibsel aus einer Zeit darstellen, wo die Befruchtung eine unsichere war.

Findet eine Bestäubung statt, so folgen die verschiedenen Stadien in der weiteren Entwicklung des Embryosacks rasch auf einander, was sehr begreiflich ist, da der Pollenschlauch bei seinem Eintritt in die Mikropyle den Embryosack zur Befruchtung schon fertig vorfindet.

Der primäre Embryosackkern wächst und schickt sich zur Teilung an, wobei die verschiedenen bei der heterotypischen Teilung beobachteten eigentümlichen Veränderungen nicht mehr eintreten. Die Teilung findet in der Mitte des Embryosacks statt und die beiden Tochterkerne wandern nach den Polen der Zelle (Taf. V, Fig. 22). Sie teilen sich bald, anscheinend gleichzeitig, denn ich fand immer die beiden Spindeln zusammen an den beiden Polenden und zwar etwa parallel zur Längsachse des Embryosacks angeordnet. Kurz nachdem die Tochterkerne in das Ruhestadium eingetreten sind, schicken sie sich zur nochmaligen gleichzeitigen Teilung an; man beobachtet dann an den beiden Polenden je zwei Spindeln, die ungefähr senkrecht aufeinander stehen (Taf. IV, Fig. 20 und 21).

Während dieser Teilung hat sich in der Mitte des Embryosacks ein grosser Saftraum gebildet, während im übrigen Cytoplasma kleine, stark tingierte, runde, strukturlose Körperchen wahrzunehmen sind, die wahrscheinlich Reste der Nukleolen, welche bei der Auflösung der Tochterkerne in das Plasma übergegangen sind, darstellen. Diese Körperchen sind nur während der Teilung der Kerne im Cytoplasma zu finden und verschwinden, wenn die Tochterkerne sich wieder rekonstruieren; dann treten auch wieder die Nukleolen in den Kernen auf. MURBECK ¹⁾ teilt ähnliches bei der Embryosackbildung der Alchemillen mit. Während im oberen und unteren Teil des Embryosacks je 4 Kerne liegen, wächst er stark in die Länge und verdrängt dabei den letzten Rest des über ihm gelegenen Nucellus, das Dermatogen, mit dem Erfolg, dass der Embryosack dann direkt an die Mikropyle grenzt. Bei diesem Längenwachstum und auch ziemlich starken Entwicklung in die Breite sind die den Embryosack ringsumgebenden Nucelluszellen, von denen nur kleine Reste übrig bleiben, verdrängt worden. Demzufolge grenzt der Embryosack fast direkt an das Integument.

Die weitere Entwicklung des Eiapparates und der Antipoden vollzieht sich nun in der gewöhnlichen, schon häufig beschriebenen Weise. Im oberen und unteren Ende des Embryosacks liegen je vier Kerne von verschiedener Grösse. Von den am Mikropylende des Embryosack liegenden Kernen, sind 2 kleiner als die beiden anderen. Diese kleineren Kerne liefern später die Synergiden, während von den beiden anderen einer zur Eizelle und der andere zu einem der beiden Polkerne wird; letzterer liegt immer etwas mehr der Mitte des Embryosacks zugekehrt. Sehen wir vorläufig von diesen Polkernen ab und betrachten die anderen Kerne etwas genauer, so bemerkt man, dass sich die drei Kerne am Mikropylende des Embryosacks mit einer dünnen Plasmamasse umgeben. Die Synergiden stossen direkt an die Mikropyle, liegen bei medianen Längsschnitten

1) Parthenogenetische Embryobildung in der Gattung Alchemilla. — Lunds Universitets Arsskrift, Bd. 36, Afdeln. 2, No. 7.

meist in der Schnittebene (Taf. V, Fig. 23) oder, was seltener der Fall ist, der eine etwas hinter dem anderen (Taf. V, Fig. 24). Die dritte ebenfalls nackte Zelle, deren Kern etwas grösser ist als jener der beiden anderen, wird zur Eizelle; letztere ist etwas tiefer inseriert und unterscheidet sich von den kurzen, annähernd runden Synergiden, durch ihre langgezogene birnförmige Gestalt (Taf. V, Fig. 23). Die Kerne der drei genannten nackten Zellen haben das gewöhnliche Aussehen der ruhenden Kerne; das Chromatin weist eine netzartige Struktur auf. Im Cytoplasma der Synergiden liegt am unteren Ende eine Vakuole, während der Kern im oberen Teil sich befindet. Bei der Eizelle ist eine Vakuole nicht vorhanden und ist der Kern in der Mitte gelegen.

Im oberen Ende des Embryosacks liegen anfangs die aus den Teilungen hervorgegangenen 4 Kerne, wovon drei zu Antipoden, und bald, ebenso wie die am unteren Ende gelegenen Zellen, zu nackten Zellen werden, indem sich um die Kerne Plasmamassen ansammeln. Die drei etwa birnförmigen Antipoden sind in Grösse und Form nicht von einander zu unterscheiden (Taf. V, Fig. 25).

Die beiden übrigbleibenden Kerne an den Polen des Embryosacks ändern bald ihre Lage, indem der am meisten nach der Mikropyle gelegene etwas nach der Mitte des Embryosacks wandert, ohne die Mitte desselben zu erreichen. Der andere Kern dagegen wandert nach unten, legt sich neben den anderen, verschmilzt aber nicht mit ihm. Auf diese Weise kommen die Polkerne etwas unterhalb der Eizelle zu liegen (Taf. V, Fig. 23). In einigen Präparaten fand ich diese Kerne mehr nach der Mitte des Embryosacks hin verschoben, aber dicht an der Wand desselben, da die Mitte von einem grossen Safttraum eingenommen wird.

Hiermit ist die Entwicklung des Embryosacks abgeschlossen und der Eiapparat befruchtungsfähig.

Während der oben beschriebenen Phasen der Entwicklung des Embryosacks haben, wie früher schon erwähnt, im Gewebe des Nucellus grosse Veränderungen stattgefunden. Frühzeitig

differenziert sich am Chalazaende im Nucellus ein Strang von etwas verlängerten Zellen, die sich von den übrigen durch grösseren Protoplasmareichtum auszeichnen und mit einem Haustorium Ähnlichkeit haben.

4. *Das Androeceum.*

a. Entwicklung der Antheren.

Eine kurze Skizze von der Entwicklung der Antheren ist bereits früher gegeben worden.

Über ihren anatomischen Bau kann ich mich kurz fassen, da dieser von dem Üblichen nicht abweicht.

Im Querschnitt ist das junge Staubblatt elliptisch und besteht aus meristematischen Zellen, die unter sich keine Differenzen aufweisen. Bald zeigt sich die erste Anlage des Connectivs und der Theken. Die Teilung der hypodermalen Zellschicht der Anthere führt zur Bildung der Pollensäcke. Diese Teilung findet parallel der Oberfläche statt und scheidet das Archespor von den Schichtzellen, welche schon frühzeitig eine verschiedene Ausbildung erfahren. Von diesen vier Zellschichten sind die Epidermis und das Endothecium, was Form und Inhalt der Zellen anbetrifft, nicht von einander zu unterscheiden. Die dritte Zellschicht ist tangential gestreckt und wird später zerdrückt. Die innerste Schicht bildet die Tapetenschicht, die sich deutlich vom übrigen Gewebe unterscheidet, da sie radial gestreckt ist.

Das Archespor, schon frühzeitig durch eine dunklere Färbung kenntlich, liegt innerhalb der Tapetenzellen. Sein Plasma ist dicht und der Kern und das Kernkörperchen gross. Die Tapetenkerne sind kleiner als die des Archespors. Auf die Veränderungen der Tapetenzellen bei der Bildung der Pollenkörner, komme ich später noch in einem besonderen Abschnitt zurück.

b. Urmutterzelle und Mutterzellen.

Die Urmutterzelle teilt sich einige Male und liefert so die Pollenmutterzellen. Der Moment dieser Teilung konnte in den

Präparaten selten abgefasst werden, und scheint schnell zu verlaufen. Nur in einem Präparat konnte ich eine Äquatorialplatte bei der Teilung der Urmutterzellen gut beobachten, wobei 16 paarweis angeordnete Chromosomen vorhanden waren. In jedem Loculus findet man 4 bis 6 Pollenmutterzellen, die ein dichtes Plasma und einen grossen Kern besitzen.

c. Synapsis und Tetradenteilung.

Synapsisphasen und Tetradenteilung finden in ähnlicher Weise statt, als bei den Embryosackmutterzellen, sodass das dort dabei Beobachtete kontrolliert werden konnte (Taf. VII, Fig. 45).

Zu bemerken ist, dass die Synapsisphasen in den Mutterzellen nicht gleichzeitig auftreten. So findet man Mutterzellen, in ein und demselben Loculus während der Synapsis und solche, welche die Metaphasen der heterotypischen Teilung zeigen. Da die verschiedenen Phasen hier noch besser zu verfolgen waren als in den Embryosackmutterzellen, werde ich im Nachfolgenden eine detaillierte Beschreibung dieser Vorgänge geben.

Die Pollenmutterzellen zeigen, bevor sie sich zur Teilung anschicken, einen grossen Nukleus mit einem feinen Netzwerk, worin Chromatinkörnchen deutlich wahrzunehmen sind; Nukleoli sind in der Ein- oder Mehrzahl vorhanden. Das Cytoplasma zeigt eine gleichmässige netzartige Struktur.

In etwas älteren Stadien werden die Chromatinansammlungen im Kerngerüst dichter und grösser, während sich ihre Zahl vermindert.

Das weitere Zusammenziehen der Chromatinansammlungen führt zur Entstehung deutlicher Chromatinscheiben. Eine genaue Zählung dieser Chromatinansammlungen war hier nicht möglich. In einem weiteren Stadium erscheinen sie bedeutend vergrössert und paarweise angeordnet, sodass eine Zählung ermöglicht wird. Ich fand deren meist 16, in einigen Fällen nur 12. Die Zählung wird durch die intensive Färbung dieser Gebilde häufig unmöglich gemacht, da dann die einzelnen Paare miteinander verschmolzen erscheinen. Die hier geschilderten Gebilde will ich, mit OVERTON, als Prochromosomen bezeichnen.

Während der Annsammlung der Chromatinkörner hat eine Vergrößerung des Kerns stattgefunden. Nachdem sich die Prochromosomen aus dem Kerngerüst herausdifferenziert haben, zieht sich der ganze Kerninhalt an einer Seite zusammen und das Gerüst erscheint sehr stark gefärbt, wie dies auch im Synapsisstadium des Embryosackmutterkernes zu beobachten ist. Die Zahl der Nukleoli hat sich verringert, sodass man im Synapsisstadium meist nur einen Nukleolus in der Kernhöhlung, ausserhalb des Kerngerüsts, findet (Taf. VII, Fig. 45). Das Ausspinnen des Knäuels aus dem Synapsisstadium konnte nicht verfolgt werden. Neben im Synapsisstadium befindlicher Kernen kommen solche vor, deren Faden sich stark verdickt hat und Anzeichen zur Segmentation aufweist. In anderen Phasen wieder ist die Segmentation schon vor sich gegangen und die Doppelchromosomen liegen im Diakinese-Stadium (Taf. VII, Fig. 46).

Die Auflösung der Kernwand und das Ansetzen der Zugfasern findet in der gleichen Weise statt, wie bei der Embryosackmutterzelle. Die Doppelchromosomen ordnen sich in der Kernplatte an und werden von Zugfasern erfasst. Im Cytoplasma sind inzwischen zahlreiche extranukleolare Nukleolen aufgetreten. Die Chromosomen weichen nach den beiden Polen der Spindel auseinander und weisen bei dieser Wanderung bereits eine Längsspaltung auf (Taf. VII, Fig. 44).

Bei dieser heterotypischen Teilung sind an jedem Pole der Spindel 8 Chromosomen angelangt, welche dort bald einen neuen Kern und eine Membran bilden. Ein vollständiges Ruhestadium dieser Kerne tritt nicht ein, was schon daraus gefolgert werden kann, dass in den Kernen die längsgespaltenen Chromosomen hervortreten.

Bei der homöotypischen Teilung sind die beiden Spindeln entweder parallel zu einander gelagert, oder die eine Spindelachse steht senkrecht auf der anderen, die Chromosomen senkrecht zur Spindelachse (Taf. VIII, Fig. 47).

Nicht lange nach der Entstehung der Tetradenkerne treten zwischen ihnen im Cytoplasma kinoplasmatische Fäden auf,

eine Zellplatte wird gebildet und die tetraëdrisch gelagerten Kerne bekommen ihre Plasmapartie. Die 4 Pollenkörnern werden nach Bildung einer Membran noch eine Zeitlang zusammengehalten und nehmen rasch an Grösse zu.

d. Der Pollen.

Die ziemlich grossen Pollenkörner der Kaffee-Arten erweisen sich als geeignete Objecte, um die Kernverhältnisse zu studieren (Taf. VIII, Fig. 48).

Die jungen Pollenkörner besitzen einen grossen Kern, der häufig in der Nähe der Membran liegt; das Plasma enthält kleine Vakuolen.

In den reifen Antheren findet man die Pollenkörner fast meist nur mit einem Kern, und eine Trennung zwischen vegetativen und generativen Kern ist noch nicht eingetreten, sondern findet erst statt, wenn die Körner aus den Antherenfächern gefallen sind. Kurz bevor der Kern sich teilt, sind die kleinen Vakuolen im Plasma verschwunden.

Im stäubenden Pollenkorn teilt sich der Kern in einen grösseren vegetativen und in einen kleineren, abgeflachten, generativen Kern, der meist an der Wand liegt (Taf. VIII, Fig. 49). Die Teilung des generativen Kernes, welche nicht verfolgt werden konnte, findet erst im Pollenschlauch statt (Taf. VIII, Fig. 50). Ich habe wiederholt versucht, die künstlich bestäubten Narben sammt ihren Griffeln zu fixieren, in Mikrotomserienschnitte zu zerlegen und zu färben, mit dem Resultat, dass die Pollenschläuche zwar deutlich zu verfolgen waren, ihr Inhalt aber nur undeutlich wahrgenommen werden konnte. Später wurden dann die bestäubten Griffel nach der von NAWASCHIN ¹⁾ für *Lilium Martagon* angegebenen Methode von mir fixiert und gefärbt, wobei Flemmingsche Lösung mittels einer kleinen Spritze in den Griffelkanal durch dessen abgeschnittene Basis eingeführt wurde, der Griffel in Stückchen zerlegt und dann noch in die Fixierungs-

1) Näheres über die Bildung der Spermakerne bei *Lilium Martagon*. — Annales du Jard. Botan. de Buitenzorg, 3-ième Supplément, 2 Partie, 1900, S. 873.

lösung gebracht wurde. Präparate nach dieser Methode behandelt und auf verschiedene Weise tingiert, ergaben bessere Resultate, trotzdem gelang es mir niemals die verschiedenen Stadien der Teilung des generativen Kernes zu erhalten. Ziemlich klare Übersichtsbilder der bereits geteilten generativen Kerne wiesen auch in Zuckerlösung gekeimte und mit Pikrocarmin gefärbte Pollenkörner auf. Um feinere Strukturen zu beobachten, darf dieses Verfahren nicht zur Anwendung kommen, da das Pikrocarmin ein energisch wirkendes Mittel ist und Quellungen verursacht.

e. Tapete.

Ich habe bereits früher darauf hingewiesen, dass sich die Tapetenzellen in den jungen Loculi von den anderen Zellen durch ihre radiale Streckung unterscheiden, während die anderen ebenfalls schichtenweise um die Urmutterzelle gelagerten Zellen mehr in tangentialer Richtung ihre grösste Ausdehnung zeigen. Im Anfang weisen die Tapetenzellen, was Färbung anbetrifft, keine Verschiedenheiten von den übrigen Zellen des Gewebes auf; ihre Kerne, deren jeder einen kleinen Nukleolus enthält, sind bedeutend kleiner als die der Urmutterzelle.

Vor, oder während der Teilung der Urmutterzelle, sind auch schon Teilungsstadien in den Tapetenzellen zu beobachten, bei welchen die Chromosomen, deren Zahl 16 beträgt, deutlich gezählt werden können.

Die stärkste Teilung der Tapetenzellen findet während der Synapsis und der Reduktionsteilung statt, wobei manchmal keine Zellplattenbildung eintritt, sodass die Zellen mehrkernig werden (Taf. VIII, Fig. 51). Dadurch schon unterscheiden sich in diesem Stadium der Entwicklung die Tapetenzellen vom übrigen Gewebe, fallen aber besonders durch die starke Tinction des Plasmas in den Präparaten sofort auf.

Es gelingt bei vorsichtiger Färbung, im Plasma der Tapetenzellen kleine, unregelmässig-gebaute Chromatinkörper zu beobachten, die sogenannten Chromidialapparate.

In älteren Stadien, wenn die Pollenkörner gebildet werden, sind die Tapetenzellen bereits resorbiert.

DIE BEFRUCHTUNG.

Es mag vielleicht befremden, dass die Befruchtung hier vor der Bestäubung behandelt wird; da es sich aber bei der Besprechung der Befruchtung hauptsächlich um morphologisch-cytologische Dinge handelt, habe ich es vorgezogen, die Befruchtungsvorgänge schon an dieser Stelle zu besprechen, während die Bestäubung in einem besonderen Kapitel zu ihrem Recht kommt.

a. Das leitende Gewebe.

Bevor ich zur Beschreibung des leitenden Gewebes übergehe, dürfte es zweckmässig sein, die Entwicklung des Griffels kurz zu erwähnen.

Die Fruchtblattanlagen entstehen als zwei hufeisenförmige Anschwellungen, deren seitliche Bänder untereinander und mit dem centralen Achsenfortsatz verwachsen sind. Die beiden Fruchtfächer entstehen, indem die beiden Fruchtblätter zu beiden Seiten der centralen Achse einen Hohlraum frei lassen.

Nachdem sich die Fruchtblätter mit dem centralen Achsenfortsatz verwachsen haben, streben sie nach oben, den centralen Achsenfortsatz, der nicht mit wächst, zurück und nur einen schmalen Kanal zwischen sich lassend. Während dieses Wachstums entstehen auf der Oberseite der Fruchtblätter Papillen. Die Spaltung der beiden Fruchtblätter, welche zur Bildung der beiden Narbenlappen führt, hat schon frühzeitig begonnen.

Das leitende Gewebe können wir in drei verschiedene Teile zerlegen, nämlich den papillösen an der Narbe, das leitende im Griffel und das leitende Gewebe innerhalb des Fruchtknotens, zwischen den Samenanlagen.

Der papillöse Teil des leitenden Gewebes erstreckt sich von den beiden Enden der Narbenlappen bis zum Teil des Griffels, wo die Trennungshälften der Narbenlappen zusammenwachsen.

Die Papillen bedecken die ganze Oberfläche der beiden Nar-

benlappen und erstrecken sich noch ein kleines Stück auf der Unterseite derselben. Bei den verschiedenen *Coffea*-Arten sind hierin kleinere Unterschiede zu bemerken; so findet man, dass die Papillen bei *C. liberica* noch einen grossen Teil der Unterseite der Narbenlappen bedecken während sie bei *C. robusta* (*C. Laurentii*) auf der Unterseite viel weniger auftreten.

An den horizontal umgebenen Enden der Narbenlappen, besonders an der Übergangsstelle von Ober- und Unterseite, sind die Papillen etwas länger als in der Mitte und dort, wo die beiden Hälften der Narbe einander berühren.

Die Papillen sind gestielte ein- oder zweizellige Haare, mit verhältnissmässig dicken Wänden, deren Plasma auf die Wand beschränkt ist, so dass sich in der Mitte ein grosser Saft Raum befindet. Das Plasma enthält zur Zeit der Reife der Narbe kleinere und grössere Tröpfchen, die sich mit Überosmiumsäure tief schwarz und mit Sudan rot färben lassen (Taf. IX, Fig. 53).

Ihre Unlöslichkeit in kaltem Alkohol und die Löslichkeit in Äther lässt vermuten, dass wir es hier mit einem fetten Oel zu tun haben. Ob letzteres die Pollenkeimung anregt, konnte ich nicht nachweisen, doch ist dies auch wenig wahrscheinlich, da es mit dem Pollen gar nicht in Berührung kommt. Das Oel wurde auch in gänzlich vertrockneten Narben, die ihre Function schon ausgeübt hatten gefunden und darf wahrscheinlich als ein ernährungsphysiologisch nutzloses Exkret angesehen werden.

Flächenschnitte durch Narbenlappen zeigen, dass die Papillen grosse Interzellularen, welche kleiner werden je tiefer man in das Gewebe der Narbe schneidet, zwischen sich lassen (Taf. IX, Fig. 56). Unterhalb des papillösen Narbengewebes liegen dünnwandige und etwas gestreckte Zellen, an die sich direkt das Gefässbündel, dessen Bau keine besonderen Eigentümlichkeiten aufweist, anschliesst.

Verfolgen wir die Narbenlappen mehr nach dem Griffel hin, so zeigt sich, dass die Papillen kürzer und stiellos werden je mehr sich die beiden Narbenlappen einander nähern. Die Papillen sind hier viel plasmareicher und dickwandiger (Taf. IX, Fig. 57).

Der Kanal, den die beiden Narbenlappen nach unten zu zwischen sich lassen wird immer kleiner, was zur Verschmelzung der Papillen führt. In diesem Teil des Griffels ist der Kanal verschwunden, um dem eigentlichen leitenden Gewebe des Griffels Platz zu machen.

Wo die Papillen mit einander verschmelzen, sind die Zellen des leitenden Gewebes ziemlich dick, werden aber etwas unterhalb dieses Teiles dünnwandig und bedeutend länger. Querschnitte durch den mittleren Teil des Griffels zeigen, dass dieser eine annähernd runde Form besitzt. Die Oberfläche ist etwas gewellt, die Epidermiszellen sind ziemlich gross und dünnwandig. Die Zellen des übrigen Gewebes ausserhalb des Gefässbündels und des leitenden Gewebes sind, in Querschnitten gesehen, annähernd rund, sehr dünnwandig und haben ziemlich grosse Intercellularen.

Im Griffel befinden sich zwei Gefässbündel und zwar in jeder ursprünglichen Hälfte ein Bündel. Die Mitte des Griffels wird eingenommen durch das specifisch leitende Gewebe, das, in Querschnitten gesehen, aus englumigen, verhältnissmässig dickwandigen, octaëdrischen Zellen, die fest aneinander schliessen und keine Interzellularien zwischen sich lassen, besteht. Längsschnitte durch diesen Teil des Griffels zeigen, dass die Zellen des leitenden Gewebes sehr lang und schmal sind. Die Kerne haben sich, entsprechend der Form der Zellen, stark in die Länge gestreckt.

Im unteren Teil des Griffels, etwa dort, wo der Griffel in das Gewebe des Fruchtknotens übergeht, sind die Zellen des leitenden Gewebes nicht mehr lang und dünn, sondern kurz und ziemlich dickwandig; ihre Kerne sind sehr gross. Das Plasma färbt sich dunkel und zur Zeit der Pollenkeimung enthalten die Zellen eine grosse Menge Tröpfchen, die sich beim Dreifarbenverfahren intensiv rot färben und vielleicht Oeltröpfchen darstellen. Das leitende Gewebe im Fruchtknoten, also der dritte Teil des leitenden Gewebes, ist viel komplizierter gebaut als im Griffel. Während im oberen Teil des Fruchtknotens die Zellen des leitenden Gewebes verhältnissmässig kurz und regelmässig

sind, werden sie nach unten, besonders nach den Funiculi hin, unregelmässig, schlauchförmig und ineinander verschlungen. Von den Funiculi aus sehen wir diese eigenartig verschlungenen Zellen sich in den Obturator, der ganz aus ihnen besteht, fortsetzen.

Der innere Bau der Zellen des leitenden Gewebes im Fruchtknoten weist noch einige Eigentümlichkeiten auf, die ich noch kurz erwähnen möchte. Bisweilen wachsen die Kerne beträchtlich an und gleichen einigermaassen in Prophase getretenen Archesporzellen. Es sei hierbei bemerkt, dass LAGERBERG ¹⁾ solche Bilder auch im leitenden Gewebe von *Adoxa* beobachtet hat.

Das leitende Gewebe des Griffels bei den Vertretern der Gattung *Coffea* ist epidermaler, das der Griffelbasis und der Funiculi dagegen subepidermaler Natur. JUEL ²⁾ unterscheidet bekanntlich die leitenden Gewebe, je nach der Art und Weise des Hinabbringens der Pollenschläuche, in zwei Kategorien, nämlich einem ectotrophen und einen endotrophen Typus. Ersterer charakterisiert sich dadurch, dass die Pollenschläuche auf der Fläche des Gewebes weiterwachsen, während beim endotrophen Typus die Pollenschläuche in oder zwischen den Zellen hervordringen. Nach dieser Terminologie wäre das leitende Gewebe von *Coffea* als endotroph zu betrachten.

b. Das Wachstum des Pollenschlauches durch den Griffel nach der Eizelle und die Befruchtung.

Wenn das Pollenkorn auf die Narbe gelangt ist, fängt es bald zu keimen an ³⁾. Die Keimstellen am Pollen sind durch, meist in der Dreizahl vorhandene, unverdickte Partien der Exine kenntlich.

Die Schläuche der keimenden Pollenkörner wachsen zuerst die Narbenpapillen entlang (Taf. IX, Fig. 54) und dringen dann

1) L. c. S. 53.

2) Studien über die Entwicklungsgeschichte von *Saxifraga granulata*. — Nov. Acta Soc. Sc. Upsal., (4), 1, S. 8.

3) Ueber Keimung der Pollenkörner im Allgemeinen siehe später.

zwischen der Basis derselben ein; ihr Wachstum wird von hierab ein streng endotrophes, während es im Anfang ein ektotrophes ist. Es ist einleuchtend, dass durch das Eindringen der Pollenschläuche zwischen die Zellen der Narbe diese stark in Mitleidenschaft gezogen werden, insbesondere wenn die Zahl der eindringenden Schläuche eine grosse ist, wie das tatsächlich häufig vorkommt; in diesem Falle wird das Narbengewebe vollständig aufgelockert. Unterhalb der Narbe verringert sich die Zahl der Schläuche stark, sodass im diesem Teil des Griffels keine grossen Deformierungen zu Stande kommen. In dem leitenden Gewebe des Fruchtknotens und besonders im Obturatorgewebe, werden die Spuren des Durchwachsens der Schläuche wieder deutlicher, was wohl damit zusammenhängt, dass die Zellen lockerer und unregelmässiger zusammengefügt sind und sich leichter auseinanderdrängen lassen.

Nach dem Eindringen der Schläuche in das spezifisch leitende Gewebe des Griffels wachsen sie in den Membranen dieser Zellen nach unten hin, weil die Zellen dieses Gewebes fest aneinander gelagert sind und keine Interzellularen besitzen. Die Schläuche schieben die Zellen gewissermaassen beiseite, was besonders deutlich an Querschnitten von Griffeln hervortritt. An Längsschnitten sind in den Schläuchen ab und zu dunkler gefärbte Teile, welche von Schleimpfropfen hervorgerufen werden, zu erkennen. Der Anwesenheit dieser Kallosepfropfen ist es zu verdanken, dass die Pollenschläuche durch Behandlung mit dem später zu erwähnenden Färbeverfahren deutlich sichtbar werden. Will man die Schläuche an Längsschnitten verfolgen, so dürfen letztere nicht zu dünn sein; an dünnen Schnitten werden die Schläuche, welche beim Herabwachsen fortwährend ihre Richtung ändern, meist in kurze Stücke zerschnitten. An Querschnitten sind die Schläuche im Allgemeinen schwerer aufzufinden, da sie nämlich denselben Querschnittsdurchmesser als die Zellen des leitenden Gewebes aufweisen, und sich nur durch die bedeutende Dicke ihrer Membran und deren starker Lichtbrechung von ersterer unterscheiden.

Nicht selten wurde an Querschnitten durch bestäubte Narben

festgestellt dass die Pollenschläuche manchmal ausserhalb des eigentlichen Leitgewebes verlaufen; mehr nach dem Griffel hin sind solche Fälle viel seltener als oben an der Narbe zu beobachten. Wenn die Pollenschläuche in das Obturatorgewebe eingedrungen sind, wird ihre Auffindung besonders dadurch erschwert, dass die Zellen des Obturators selber wie Schläuche in einander verschlungen sind, und erstere sich nur durch stärkere Tinction von letzteren unterscheiden.

Wenn der Pollenschlauch an der Mikropyle angelangt ist, drängt er sich durch die schmalen Spalte der Mikropyle. In manchen Fällen lässt das Integument fast keine Mikropyle übrig, sodass der Pollenschlauch gezwungen ist, sich gewaltsam durch dieses Gewebe zu drängen und dabei viele Zellen zerstört. Die Reste dieser zerstörten Zellen dienten mir bei meinen Untersuchungen häufig dazu, schnell zu entscheiden, ob eine Befruchtung stattgefunden hatte, da der Pollenschlauch selbst an befruchteten Samenknospen schwer aufzufinden ist. Solche Reste getöteter Zellen, die man auch nicht selten im Griffel längs dem Wege des Schlauches, doch nicht so häufig als in der Samenknospe, findet, sind daran zu erkennen, dass ihre Kerne lange, dunkelgefärbte, unregelmässige Chromatinmassen darstellen.

Die eigentliche Befruchtung, also das Eindringen des Schlauches in den Embryosack und das Verschmelzen der Kerne konnte ich einige male deutlich beobachten. Im Verhältniss zu der von mir untersuchten grossen Anzahl von Präparaten von Befruchtungsstadien waren diese Fälle dennoch vereinzelt.

Wenn der Pollenschlauch bei dem Embryosack angelangt ist, drängt er sich zwischen Synergiden, Eizelle und Embryosackwand hervor und legt sich hierbei der unteren Hälfte der Eizelle, beim Eikern an. Gleichzeitig mit dem Hervordringen bläht sich der Endteil des Pollenschlauches keulenförmig auf und sammelt sein Plasma in diesem Teile an (Taf. V, Fig. 24). Dieses Anschwellen beruht tatsächlich auf einer Vergrösserung des Lumens und nicht auf eine Verdickung der Membran. Letzteres ist bei der Keimung des Pollenkorns in künstlichen Kulturen der Fall,

wobei die Membran deutlich geschichtet erscheint. Vielleicht stellt diese Verdickung der Membran in künstlichen Kulturen ein krankhaftes Stadium dar, da sie an durch den Griffel hindurch gewachsenen Pollenschläuchen niemals beobachtet wurde.

Während sich der Schlauch an die Eizelle anlegt und sein Ende aufbläht, sind die generativen Kerne deutlich sichtbar (Taf. V, Fig. 24 und 26).

Eine Desorganisation der Synergiden während des Eindringens des Pollenschlauches in den Embryosack war nicht zu konstatieren, was hier besonders betont werden dürfte, da das Intaktbleiben der Synergiden bei der Befruchtung eine nicht allgemeine Erscheinung darzustellen scheint. Bei ähnlichem Verlauf des Pollenschlauches bei *Lilium* konstatierte z. B. COULTER ¹⁾ das die von dem Schlauch berührte Synergide bald desorganisiert; SCHAFFNER ²⁾ fand dasselbe bei *Alisma Plantago* und *Sagittaria variabilis*. Dagegen berichtet LAGERBERG ³⁾ dass bei *Adoxa*, bei einem ähnlichen Verlauf des Schlauches, eine Degeneration der Synergiden nicht beobachtet werden konnte und MERRELL ⁴⁾ giebt für *Silphium* an, dass die beiden Synergiden nach vollzogener Befruchtung nicht desorganisiert erscheinen.

Das Hinübertreten der generativen Kerne in die Eizelle und sekundären Embryosackkern ist deshalb schwer zu erkennen, weil sich das mit Plasma gefüllte Schlauchende stark färbt und ausserdem die Eiapparate während der Kernverschmelzung im stark tingierten Plasma eingebettet liegen. Immerhin ist es mir doch gelungen, bei sorgfältigster Färbung eine „Doppelbefruchtung“ genauer zu verfolgen. Eine solche wurde bekanntlich zuerst von NAWASCHIN ⁵⁾ und GUIGNARD ⁶⁾ bei verschiedenen Lilia-

1) Contribution to the lifehistory of *Lilium philadelphicum*, I, The embryosac and associated structures. — Bot. Gaz., 25, 1897, S. 417.

2) The embryosac of *Alisma Plantago*. — Bot. Gaz., 21, 1896, S. 127. — Contribution to the lifehistory of *Sagittaria variabilis*. Ebenda, 23, 1897, S. 256.

3) L. c., S. 57.

4) A contribution to the lifehistory of *Silphium*. — Bot. Gaz., 29, 1900, S. 415.

5) Neue Beobachtungen über die Befruchtung bei *Fritillaria tenella* und *Lilium Martagon*. — Ref. im Bot. Centralbl. 1899, I, S. 62 und 241.

6) Sur les Anthérozoides et la double copulation sexuelle chez les angiospermes. — Revue générale de Bot., VI, Sér., T. XI, 1899, S. 129.

ceen beobachtet und später von mehreren Forschern auch bei anderen Pflanzen gefunden.

Die beiden Spermakerne haben, wenn sie aus dem Pollenschlauch hinausgelangen, eine ellipsoidische Gestalt und sind anscheinend völlig nackt. Vielleicht liegt hier eine ähnliche Erscheinung vor, wie sie bereits JUEL¹⁾ bei *Pyrola* und LAGERBERG²⁾ bei *Adoxa* beobachtet haben. Die beiden generativen Kerne gehen in den Embryosack über, wobei die Verschmelzung des einen Kernes mit der Eizelle eine sehr schnelle ist, während der zweite langsamer nach den beiden Polkernen wandert. So kommt es, dass sich die Eizelle schon vergrößert und zur ersten Teilung angeschickt hat, während die Verschmelzung der Polkerne mit dem zweiten generativen Kern erst vor sich geht.

Was diese Verschmelzung anbelangt, so konnte ich einige Unterschiede darin konstatieren. Entweder liegen die Polkerne noch getrennt von einander, wenn der generative Kern mit den am meisten nach der Eizelle hin gelegenen verschmilzt (Taf. V, Fig. 27), oder es hat schon vorher eine Verschmelzung der beiden Polkerne zum primären Endospermkern stattgefunden, mit dem sich der generative Kern dann erst vereinigt.

Ich habe früher schon hervorgehoben, dass bei der Fertigstellung des Embryosacks die beiden Polkerne nicht miteinander verschmelzen. Tritt dagegen eine Befruchtung ein, so kann unter Umständen noch vor der Verschmelzung mit dem generativen Kern, eine Fusion der beiden Polkerne stattfinden. Übrigens scheint diese Verschiedenheit in den Befruchtungsvorgängen von äusseren Einflüssen bedingt zu werden.

Die Untersuchungen von SHIBATA³⁾ über die vegetative Befruchtung bei *Monotropa*, machen es sehr wahrscheinlich, dass sie in hohem Grade von äusseren Einflüssen abhängig ist. SHIBATA glaubt den Grund einer Vereinigung oder Nichtvereini-

1) Studien über die Entwicklungsgeschichte von *Saxifraga granulata*. — Nov. Acta Soc. Sc. Upsal. (4), 1, 1907, S. 15.

2) L. c.

3) Die Doppelbefruchtung bei *Monotropa uniflora*. — Flora 90, 902, S. 64.

gung der Polkerne, in der Einwirkung verschiedener Temperaturen suchen zu müssen.

Nach der Fusion des primären Endospermkernes mit dem generativen Kern nimmt erstere bedeutend am Grösse zu. Ein Ruhestadium scheint nicht zu existieren, da die Endosperm-bildung gleich nach der Befruchtung eintritt. Dagegen macht die befruchtete Eizelle eine kleine Ruheperiode durch und die Teilungen finden nicht gleich nach der Verschmelzung mit dem generativen Kern statt. Vor Eintritt der ersten Teilung verlängert sich die Eizelle etwas und erst dann wird die Embryokugel abgetrennt; die weiteren Teilungen verlaufen normal und bieten keine Veranlassung, weiter darauf einzugehen.

Bevor ich dies Kapitel verlasse, möchte ich noch erwähnen, dass nach dem Austritt der generativen Kerne aus dem Pollenschlauch in den sogenannten Restkörper, der seinen Platz lange beibehält, nach vollzogener Befruchtung zwei kernartige Körper liegen. Solche Körper sind bei einer Anzahl von Pflanzen bereits mehrfach beobachtet worden, so z. B. von SHIBATA ¹⁾ ERNST ²⁾ LAND ³⁾ GUIGNARD ⁴⁾ JUEL ⁵⁾ und LAGERBERG ⁶⁾. JUEL fasst diese Körper als zwei desorganisierte Kerne auf, nämlich den Schlauch- und den Synergidenkern. Er glaubt, diese Ansicht aus den Fällen folgern zu dürfen, in denen die Synergiden bei der Befruchtung nicht desorganisiert werden und nur ein derartiger Körper im Schlauchende wahrzunehmen ist. LAGERBERG ⁷⁾ ist, nach dem von ihm bei *Adoxa* Beobachteten, derselben Ansicht.

VORGÄNGE NACH DER BEFRUCHTUNG.

a. Das Schwinden des Obturators.

Im Vorigen wurde schon hervorgehoben, dass die Pollenschläuche ihren Weg nach dem Embryosack durch den Obturator

1) Die Doppelbefruchtung bei *Monotropa uniflora*. — Flora 90, 902, S. 64.

2) Beiträge zur Kenntniss der Entwicklung des Embryosacks und des Embryo bei *Tulipa Gesneriana* L. — Ebenda, 88, 1901, S. 50.

3) Double Fertilisation in Compositae. — Botan. Gaz., XXX, 1900, S. 255.

4) L'appareil sexuel et la double fécondation dans les Tulipes. — Ann. Sc. Nat. Bot., 41, 1900, S. 186.

5) L. c., S. 20.

6) L. c., S. 58.

7) L. c., S. 58.

nehmen und dieses für die *Coffea*-Arten charakteristische Gewebe denselben anatomischen Bau aufweist, wie das leitende Gewebe im Fruchtknoten in der Nähe der Funiculi. Ein solches Gewebe zwischen Placenta und Mikropyle bzw. Nucellusspitze wurde bereits bei einigen anderen Pflanzen gefunden, (Euphorbiaceen, BAILLON, MIRBEL, BRONGIART; *Linum perenne*, PAYER) doch scheint man der Ansicht gewesen zu sein, dass dieses Gewebe eine metamorphosierte Samenanlage darstellt. Diese Ansicht wurde dann schon von CAPUS ¹⁾ und später auch von SCHWEIGER ²⁾ abgewiesen, mit der Annahme, dass der Obturator ein neugebildetes Organ darstellt, das den Charakter eines Leitungsgewebes besitzt. Der beste Beweis für diese letzte Annahme ist wohl der Umstand, dass Pollenschläuche im Obturator kurz vor der Befruchtung gefunden worden sind, und der Obturator nach der Befruchtung verschwindet.

Bei den untersuchten *Coffea*-Arten hat der Obturator seine grösste Ausdehnung zur Zeit der Befruchtung und schwindet rasch nach diesem Act bis auf wenige Reste an der Placenta. Schnitte durch das Obturatorgewebe nach der Befruchtung zeigen, dass die schlauchartigen Zellen aufgelöst werden und auseinander fallen, sodass schliesslich nur noch kleine Fetzen übrig bleiben.

b. Endosperm bildung.

Die Entdeckung der Copulationsvorgänge zwischen dem zweiten generativen und den beiden Polkernen war für die Anschauung über die Endosperm bildung von grosser Bedeutung. Diese Copulation stellt eine richtige Befruchtung dar, bei der erbliche Eigenschaften übertragen werden. Dies haben besonders DE VRIES ³⁾ und CORRENS ⁴⁾ experimentell nachgewiesen.

1) Anatomie du tissu conducteur. — Ann. d. Sc. Nat., Bot., 6 Sér. VII, T. 1878, S. 226.

2) L. c. S. 371.

3) Sur la fécondation hybride de l'albumen. — Comptes rendus de l'Acad. d. Sc., 1899, No. 23, S. 973—975.

4) Untersuchungen über die Xenien bei *Zea Mays*. — Ber. d. Deutschen Botan. Ges., Bd. XVII, 1899, Heft 10, S. 410—417.

Die Endosperm Bildung bei den *Coffea*-Arten bietet keine besonders interessanten Einzelheiten. Die erst gebildeten Endospermkerne sind gross und lagern sich in das wandständige Plasma. Die Anatomie des fertigen Endosperms wurde schon von MARSCHAND ¹⁾, FROEHNER ²⁾ und HANAUSEK ³⁾ genauer beschrieben. Der Vollständigkeit halber lasse ich hier folgen, was bei FROEHNER hierüber zu finden ist. Die Zellen sind im centralen Teil nach allen Richtungen gleichmässig tangential gestreckt und bekleiden tafelförmig die Embryospalte. Die Endospermzellen haben stark verdickte Wände und bestehen nach REISS hauptsächlich aus einem Polysaccharid der Mannose. Die Zellwandverdickungen sind charakteristische, parallele und verzweigte Leisten, welche die weniger verdickten Stellen als flache Gruben zwischen sich freilassen, auf den Wandquerschnitten als Knoten und auf der Flächenansicht strahlig oder leiterartig angeordnet erscheinen. Sie finden sich auf allen Seiten der Zellen, fehlen jedoch den Grenzzellen und deren nächsten Nachbarn, sowohl nach der Aussenseite, wie nach der Embryospalte hin. An den Enden des Samens, wo bei der Aufrollung des Nährgewebes infolge der ovalen Gestalt des Samens der Druck besonders stark war, zeigen die Zellen mehr collenchymatische Verdickung und sind seitlich sehr stark zusammengedrückt. Poren fehlen vollständig.

HANAUSEK fand die Verdickungen aus drei Schichten bestehend, die aber erst bei der Präparation erkennbar werden und nach ihm erst im zehnten Monat.

Weitere Einzelheiten über das Endosperm giebt TSCHIRCH ⁴⁾. In der Mitte wird das Endosperm von einem Längsspalt durchzogen, der mit Quellgewebe ausgefüllt ist und schon bei Lupenbetrachtung deutlich hervortritt. Das Quellgewebe besteht aus dünnwandigen, plasmareichen, oft obliterierten oder verschleim-

1) L. c. S. 5.

2) L. c. S. 243.

3) Die Entwicklung der Frucht und des Samens von *C. arabica*. — Zeitschr. f. Nahrungsmitteluntersuch. und Hygiene, 1885, 1890, 1893.

4) Anatomischer Atlas der Pharmakognosie und Nahrungsmittelkunde. — 1900, S. 69, Tafel 18.

ten Zellen, die in Wasser quellen und deren Wand nicht auf Cellulose reagiert, und kommt hier dadurch zu stande, dass die Verdickung der Endospermzellen nicht bis zur Endospermmitte fortschreitet, sondern kurz vor derselben halt macht. Der von Quellgewebe erfüllte Spalt wird also erst nach Verdickung der Zellen sichtbar. Wenn bei der Keimung das Würzelchen, dessen Spitze ganz oberflächlich liegt und daher schon am ungequollenen Samen sichtbar ist, die Hülle durchbohrt und im Boden sich befestigt hat, wachsen die Kotyledonen in das Quellgewebe hinein.

An einem in Chloral eingetrockneten Schnitt tritt im Inhalte aller Endospermzellen eine schön rot-violette Färbung ein, die man auch bisweilen schon beim Einlegen in Chloral beobachtet. Durch Phosphormolybdänsäure lässt sich der Inhalt der Endospermzellen tief orangerot, durch Ammoniak hellgelb färben; der Luft ausgesetzte, mit Ammoniak befeuchtete Schnitte werden bald grün. Kali färbt hellgelb, Eisenchlorid grünlich (Gerbsäure). Der Zucker lässt sich mittels Fehlingscher Lösung nachweisen, das fette Oel durch Schwefel- (Zusammenfliessen der Tropfen) oder Überosmiumsäure (Braunfärbung).

Für nähere Einzelheiten über chemischen Beschaffenheit des Gewebes, verweise ich auf die Arbeit von TSCHIRCH und OESTERLE.

c. Endospermspalte (Ligne- oder cavité-embryonaire MARSCHAND's, Mittelschicht JAGER's, Trennungs- oder Auflösungsschicht HANAUSEK's, Quellgewebe TSCHIRCH's).

Bei der Besprechung der Endospermbildung wurde schon betont, dass das Endospermgewebe in der Mitte von einem Längsspalt durchzogen wird, den verschiedene Forscher mit den oben angegebenen Namen bezeichneten. MARSCHAND, der zuerst auf diese dunkle Linie im Endosperm aufmerksam gemacht hat, untersuchte sie mikroskopisch und erkannte auch die eigentümlichen Veränderungen die diese Schicht erfährt. Er erfasste bereits die physiologische Bedeutung dieses Gewebes, als eine Art Haustorium zu wirken, um die Reservestoffe in gelöstem

Zustand nach dem Embryo hinzuleiten. Auch HIRSCH ¹⁾ der unter anderen auch Samen von *C. arabica* daraufhin untersuchte, hat einige Einzelheiten hierüber publiziert.

Untersucht man Samen des Kaffees in Längs- und Querschnitten, so findet man, dass um den Embryo ein Gewebe existiert, welches die Grenzschicht des Endosperms gegen diesen hin darstellt. TSCHIRCH nannte dieses Gewebe, weil es bei der Keimung stark aufquillt, „Quellgewebe“. Betrachtet man dieses Quellgewebe in aufeinander folgenden Stadien der Keimung des Samens so ergibt sich ein genaues Bild seiner Function.

Das um den Embryo befindliche, durchsichtige Gewebe quillt, wie wir schon betonten, bei der Keimung stark auf und legt sich an den Seiten eng an den Embryo an. Ober- und unterhalb des Embryos wird dieses Gewebe dagegen aufgelöst und die Kotyledonen wachsen in den auf diese Weise entstandenen Spalt hinein. Die Kotyledonen schmiegen sich in diesem Spalt dem Endospermgewebe eng an und die Auflösung schreitet dann von den Keimblättern ausgehend, in centrifugaler Richtung fort. Das Quellgewebe vermittelt die Aufnahme des in dem Endosperm aufgehäuften Reservematerial: des Oels, des Plasmas und der Reservecellulose seitens der Kotyledonen. Diese Befunde zeigen, dass das Quellgewebe bei der Keimung als ein Haustorium fungiert, indem es eine Verbindung zwischen Embryo und den Endospermzellen herstellt und die Reservestoffe aus dem Endosperm dem Embryo zuführt.

d. Der Embryo.

Die Anatomie des Embryos wurde schon von MARSCHAND, FROEHNER, HANAUSEK und anderen beschrieben. FROEHNER teilt darüber folgendes mit: „Der Embryo besteht aus einem kleinzelligen Gewebe, welches Oel, Stärke und Plasma enthält. Es wird von rundlichen Zellen gebildet, welche anfangs deutlich

1) Welche Einrichtungen bestehen belufts Ueberführung der in dem Speichergewebe der Samen niedergelegten Reservestoffe in den Embryo bei der Keimung? — Ber. d. Deutschen Botan. Ges., Bd. 8, 1890, S. 1.

Interzellularräume erkennen lassen, die aber bei der Vermehrung der Zellen im beschränkten Raume scheinbar verschwinden. Die Zellen der obersten, stark gedrückten Schicht bilden die Epidermis. Würzelchen und Stämmchen zeigen anfangs keinen beträchtlichen Unterschied. Auf die Epidermis folgt das zarte, weitmaschige Grundgewebe, welches durch mehrere Schichten dichter und kleiner Zellen, in das Mark und das Rindengewebe geschieden ist. Die trennende Schicht, an deren Innenseite die ersten Gefässe angelegt werden, ist beim Stämmchen weniger dicht, als beim Würzelchen. Die Kotyledonen lassen zwischen den Epidermen ein gleichmässiges Gewebe erkennen, das sich an den Anlagen der Nerven verdichtet und diese makroskopisch als dunkle Linien hervortreten lässt. Über die Nervatur der Kotyledonen herrscht in der Litteratur ein Meinungsunterschied."

e. Die Samenschale.

Die Samenschale besteht zu äusserst aus einer Epidermis, deren einzelne Zellen zu Sclereiden umgebildet sind, welche nach Tschirch den Silberglanz der Samenhaut oder Silberhaut bedingen. Nach letztgenanntem Forscher sind die äusseren Schichten des Samenschalenparenchyms normal erhalten, die inneren wie ein Nährschicht obliteriert und nunmehr stärkefrei.

Diese Zellen sind rechtwinkelig zur Längsachse des Samens gestreckt. Ihre Obliteration bewirkt die Lostrennung der anfangs dem Endosperm fest anhaftenden Samenhaut, die vom reifen Samen leicht losgelöst werden kann. Die eigentümliche Faltung des Samens, die dem Querschnittsbild des reifen Kaffeesamens ein so charakteristisches Aussehen verleiht, vollzieht sich erst nachträglich an der Samenanlage. Die Samenschale, die den äusseren, gegen die Fruchtwand zu gelegenen Teil des Samens als silberglänzende, leicht ablösbare Haut bedeckt, muss natürlich auch in die an der Scheidewandseite gelegene Falte eindringen. Die Sclereiden der Epidermis sind ausserordentlich charakteristisch und trotz ihrer verschiedenen Gestalt leicht auf den ersten Blick hin zu erkennen. Die Zellen sind von

kurzer und breiter, bald von gekrümmter, ausgebuchteter oder verbogener Gestalt, bald gerade oder stabförmig, doch immer mit einer relativ dünnen Membran versehen. An der äusseren, konvexen Seite des Samens sind die Sclereiden im Allgemeinen ebenso gestaltet wie in der Samenhautfalte an der oberen Furchenseite; an der konvexen Seite des Samens ist häufig eine Neigung zur Längsstreckung der Sclereiden zu konstatieren was vielleicht mit der mit der fortschreitenden Volumvergrößerung des Samens bewirkten Zugwirkung, zusammenhängt.

UNREGELMÄSSIGKEITEN BEI DER ENTWICKELUNG.

a. Bildung von runden Samen (Perlkaffee).

Wie früher schon betont wurde, entwickeln sich in einem Fruchtknoten gewöhnlich zwei Samenknospen, die nach eingetretener Befruchtung auch zwei Samen liefern. Nun kommt es aber gar nicht so selten vor, dass in einer Frucht nur ein Same gefunden wird, während der andere abortiert ¹⁾ ist. Der normale Same wird hierdurch beim Heranwachsen in seiner Ausdehnung nicht von dem anderen gehindert, drückt die Scheidewand beiseite und füllt so die ganze Fruchthöhle aus. Dadurch erscheint der Same fast rund, nicht plankonvex, und das Endosperm ist dann spiralig eingerollt.

b. Sogenannte „Polyembryonie“.

Bei der Untersuchung einer grossen Anzahl von Samen fand ich ab und zu sogenannte „polyembryonische Samen“. Unter dieser Bezeichnung versteht man die Erscheinung, dass in einem Samen mehrere Embryonen vorkommen.

Es ist mir leider nicht gelungen, solche Fälle von „Polyembryonie“ entwicklungsgeschichtlich zu verfolgen. Das mir zur Verfügung stehende Material war bereits in einem vorgeschrittenen Stadium der Entwicklung begriffen, doch konnte ich immerhin aus dem anatomischen Bau solcher Samen auf die Entwicklungsgeschichte schliessen.

1) Nähere Einzelheiten, siehe Kapitel: Sterilität.

Bereits vor mir hatte HANAUSEK ¹⁾ die Bildung „polyembryonischer Samen“ genauer verfolgt und ich kann, soweit mein Material dies gestattete, seine Ausführungen bestätigen. Auch HANAUSEK erkannte, ohne die Entwicklungsgeschichte genauer zu verfolgen, dass die doppelembryonischen Samen zwei getrennte Endosperme und getrennte Samenhäute haben. Der Priorität wegen lasse ich hier die Ausführungen HANAUSEK's folgen, um zuletzt meinen Standpunkt in dieser Frage zu präzisieren:

„Das äussere, naturgemäss viel grössere Endosperm stellt einen asymmetrischen, auf der Ventralseite breit-offenen Körper dar, an welchem der eine Längsrand nach vorn (ventral) umgeschlagen ist und gewissermassen ein Dach bildet; der andere Längsrand dagegen liegt tiefer und endet in eine Kante, ohne sich umzufalten. In dem auf diese Weise geschaffenen Hohlraum liegt, genau dem Contour des äusseren Endosperms angepasst, das innere, welches bis auf die Grösse und den viel weniger regelmässigen Umriss, einem normalen Kaffeesamen gleicht, eine Ventralrinne und den von letzterer ausgehenden, in das Innere eindringenden Spalt besitzt. Auch an dem sogenannten Perlkaffee, dem Samen einer einsamigen Kaffeefrucht, ist die Diploembryonie schön entwickelt. Beide Endosperme bilden den für den Perlkaffee charakteristischen cylindrischen Körper, das äussere Endosperm umgreift bis auf eine schmale Zone vollständig das innere.“

Ich habe bei der Untersuchung der Samen nur „Diploembryonie“ beobachten können, während HANAUSEK angiebt, ein einziges Objekt gefunden zu haben, das zweifellos drei Endosperme enthielt.

Fassen wir zunächst die Fälle von echter und unechter Polyembryonie näher ins Auge.

Die eigentliche Polyembryonie kann erstens dadurch entstehen, dass sich die Embryonen aus ausserhalb des Embryo-

1) Ueber Symmetrie und polyembryonische Samen von *Coffea arabica* L. — Ber. d. Deutschen Botan. Ges., Bd. 13, 1895, S. 73. Dort auch Abbildungen polyembryonischer Samen (d. A.).

sacks gelegen Zellen gebildet haben. Zum Beispiel können solche Adventivembryonen aus den Nucellarzellen entstehen, was bei *Funkia orata*, *Coelogyne ilicifolia*, *Mangifera indica* u. a. der Fall ist, oder die Adventivembryonen bilden sich aus den Zellen des inneren Integuments, wie bei *Allium odorum*. Weiter kann die echte Polyembryonie dadurch entstehen, dass die Embryonen aus Embryosackelementen gebildet werden. In diesem Falle existieren von Anfang an normalerweise zwei Eizellen, wie bei *Santalum album*, weiter können aus den Synergiden Embryonen hervorgehen, wie dies bei *Taraxacum officinale*, *Aconitum Napellus*, *Mimosa Denhartii* u. a. der Fall ist, oder es entwickeln sich aus den Antipoden Embryonen, wie bei *Allium odorum*. Zu dieser Kategorie der echten Polyembryonie gehören noch diejenigen Fälle, in denen mehrere Embryonen dadurch entstehen, dass sich der Embryovorkeim spaltet wie bei *Loranthus europaeus*, oder sich ein Vorkeimträger entwickelt, der mehrere Embryovorkeime besitzt, wie bei *Erythronium americanum* ¹⁾).

Die unechte Polyembryonie kann erstens dadurch entstehen, dass die Samenanlagen zusammen verwachsen, wie das z. B. bei *Pirus Malus*, *Loranthus europaeus* und *Viscum album* der Fall ist. Bei *Pirus Malus* konstatierte man diese unechte Polyembryonie an einem Beispiel, wo die beiden Embryonen durch Verschmelzung der Integumente in einer Samenschale eingeschlossen waren. Die unechte Polyembryonie kann weiter dadurch entstehen, dass sich der Nucellus teilt, wie bei *Morus alba*, *Orchis Morio* und *Gymnadenia conopea*; ERNST rechnet hierzu auch *Coffea arabica*, scheint aber allerdings noch in Zweifel zu sein, ob die unechte Polyembryonie des Kaffees in dieser Kategorie unterzubringen ist, da er hinter den Namen ein Fragezeichen setzte. Ich bin mehr der Ansicht, dass beim Kaffee von Anfang an zwei getrennte Samenanlagen im Fruchtfache bestehen, was aus dem Vorhandensein von zwei getrennten

1) Für Litteraturangaben vergleiche man die schöne Zusammenstellung der Fälle von Polyembryonie von ERNST. L. c., 3, 63.

Samenhäuten um die beiden Samen gefolgert werden darf, oder aber die Spaltung der Samenanlage müsste schon sehr frühzeitig, noch vor der Bildung der einzigen Integuments geschehen sein. Die Entscheidung kann nur die Entwicklungsgeschichte bringen. Ich habe diese Frage besonders ins Auge gefasst und werde noch weiter versuchen, hierüber Klarheit zu bekommen.

Jedenfalls geht aus Obengesagtem deutlich hervor, dass beim Kaffee keine echte, sondern unechte Polyembryonie vorliegt, und es richtiger wäre, in Zukunft von unechten polyembryonischen Samen beim Kaffee zu reden.

Solche unechte Polyembryonie fand ich bei verschiedenen Kaffee-arten, so ausser bei *C. arabica* noch bei *C. liberica* und *C. Laurentii* (*C. robusta*). HANAUSEK und auch ZIMMERMANN¹⁾ erwähnen sie nur für *C. arabica*.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER BESTÄUBUNG UND BEFRUCHTUNG BEI KAFFEE-ARTEN.

Unsere Kenntnisse von der Bestäubung der Kaffeeblüte weisen noch manche Lücken auf, weshalb ich es unternahm, diese Frage nach der experimentellen Seite hin zu prüfen.

Die einzigen Forscher, die sich etwas mit dem Problem der Bestäubung beschäftigten, waren eigentlich nur BURCK²⁾ und ZIMMERMANN³⁾. BURCK hat in seiner Arbeit kurz einiges über die Bestäubung von *C. arabica*, *C. liberica* und *C. bengalensis* mitgeteilt und ZIMMERMANN stellte hierüber einige Versuche an, die er aber nicht in der Lage war fortzusetzen. Es wird zweckmässig sein, zuerst das Resultat der Untersuchung BURCKS und ZIMMERMANN'S hier festzustellen, worauf ich mich dann über meine Untersuchungen äussern werde.

Die Untersuchungen von ZIMMERMANN haben gezeigt, dass sich

1) Eenige pathologische en physiologische waarnemingen over koffie. — Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin, LXVII, 1904, S. 84.

2) Sur l'organisation florale chez quelques Rubiacées. — Ann. d. Jard. Bot. d. Buitenzorg, Vol. IV, 1884.

3) L. c. S. 96.

die Blüten von *C. liberica* schon im Knospenzustand autogam bestäuben. Weiter ging aus seinen Versuchen hervor, dass die Antheren und die Pollenkörner durch Wasser und feuchte Luft nicht geschädigt werden und der Pollen sogar in Wasser sehr schön keimt.

BURCK machte auf einen Unterschied in der Länge der Griffel an Blüten von *C. arabica* aufmerksam und betonte, dass dadurch sowohl Autogamie als Xenogamie vorkommen kann.

Dies ist eigentlich alles, was bis jetzt über die Bestäubung der Kaffeeblüte bekannt geworden ist.

Bevor ich nun zu meinen eigenen Untersuchungen übergehe, dürfte es nicht überflüssig sein, noch kurz auf den normalen Bau der Kaffeeblüte hin zu weisen.

Die Kaffeeblüte hat einen kleinen, rudimentären Kelch und eine verwachsene Blütenkrone, die nach unten hin eine Röhre bildet und nach oben in 5 breite Kronlappen endet. Die Antheren, welche mit den Kronzipfeln abwechseln, sind ebenfalls in der Fünzfzahl vorhanden und unten mit der Blütenröhre verwachsen. Der Fruchtknoten besitzt einen Griffel, der oben in einer zweilappigen Narbe endet, und weist an seinem oberen Rande einen Discus auf.

Wie ZIMMERMANN gezeigt hat, können bei Blüten des *Liberia*-Kaffee's Pollen ohne Hülfe von Wind oder Insekten auf die Narbe kommen und zwar dadurch, dass sich die beiden horizontal umgebogenen Narbenlappen in der Knospe schon mit den bereits geöffneten Antherenfächern berühren. Untersucht man z. B. eine Blüte des *Liberia*-Kaffee's einige Stunden vor dem Erblühen, so findet man stets zahlreiche Pollenkörner auf den Narbenlappen; meist sind schon einzelne Körner gekeimt und haben ihre Keimschläuche zwischen die Narbenpapillen wachsen lassen. Ich habe etwa 78 Blüten untersucht und nur in 8 Fällen gefunden, dass in der Knospe noch keine Bestäubung stattgefunden hatte. Man ist also berechtigt, anzunehmen, dass die *Liberia*-Blüte sich bereits im Knospenzustand bestäubt. Hiermit ist aber die Frage nach der Bestäubung bei *C. liberica* noch lange nicht gelöst, denn weitere Untersuchungen zeigen

bald, dass die Bestäubungsverhältnisse nicht so einfache sind. Zahlreiche experimentelle Bestäubungsversuche haben mir gezeigt, dass, obwohl sich die Blüte schon im Knospenzustand bestäubt, nicht immer eine Selbstbefruchtung stattfindet.

Es wurde oben betont, dass beim Öffnen der Blüte schon Pollenkörner an den Narbenpapillen kleben und einige von ihnen bereits Schläuche getrieben haben. Bleibt die Blüte nun sich selbst überlassen so wachsen die Keimschläuche durch den Griffel weiter und befruchten die beiden Eizellen. Eine solche Autogamie findet statt, wenn sich auf der Narbe nur eigene Pollenkörner befinden.

Kommt dagegen Pollen einer anderen Blüte auf die Narbe, so hängt das Zustandekommen einer Selbst- oder Fremdbefruchtung ganz von der Zeit ab, in der der fremde Pollen auf die Narbe fällt. Erfolgt z. B. früh morgens, kurz nach dem Erblühen, eine Fremdbestäubung, so findet eine Fremdbefruchtung statt, weil die Keimschläuche der fremden Pollenkörner viel schneller durch den Griffel wachsen als die der eigenen und die Schläuche des fremden Pollens viel früher bei den Eizellen ankommen. Fallen dagegen fremde Pollenkörner viel später auf die Narbe als die eigenen, so werden die Schläuche der fremden Pollenkörner trotz ihrem schnelleren Wachstum die eigenen doch nicht mehr einholen, sodass eine Selbstbefruchtung eintritt ¹⁾.

Bevor ich auf die Bestäubung und Befruchtung des *Liberia*-Kaffee's weiter eingehe, möchte ich mich über meine Untersuchung, dass fremder Pollen viel schneller eine Befruchtung zu stande bringt als eigener, äussern.

Beim Studium der Keimung und des Wachstums der Pollenschläuche innerhalb des Griffels fiel es mir auf, dass die Keimschläuche viel üppiger auf Narben fremder Blüten als auf ihren eigenen wachsen. Leider war das Wachstum nicht lange zu verfolgen, da sofort nach dem Eindringen in das Griffelgewebe der Keimschläuch nicht mehr weiter zu beobachten war ohne

1) In den meisten Fällen wird der fremde Pollen, wenn er später auf die Narbe fällt, überhaupt nicht mehr keimen, weil, wie ich später noch genau anführen werde, die Narbenpapillen ziemlich schnell vertrocknen.

den Griffel zu zerschneiden, was dann meist auch eine Verletzung des Keimschlauches zur Folge hat. Ich suchte deshalb zuerst nach einer Methode, das Wachstum der in das Griffelgewebe eingedrungenen Keimschläuche zu studieren, ohne den Griffel zerschneiden zu müssen. Dies gelang, wenn ich den Griffel zuerst einige Zeit in Milchsäure aufhellte und ihn dann auf einige Minuten in Wollblau oder auch eine verdünnte Methylblaulösung brachte.

Auf diese Weise war es möglich an einer grösseren Anzahl von Griffeln folgende Untersuchungen anzustellen:

Blüten von *C. liberica*, deren Erblühen an nächsten Tage erfolgen sollte, wurden kastriert, d. h. der Blütenkrone mit den Antheren beraubt, sodass nur der Griffel übrig blieb, und in Papierdüten abgeschlossen, um sie vor unerwünschter Bestäubung zu schützen. Die abgeschnittenen Antheren, die von mir in kleinen etwas feucht gehaltenen Gläschen aufbewahrt wurden, öffneten sich am nächsten Morgen, häufig auch schon etwas früher. Am nächsten Morgen erfolgte dann eine künstliche Selbstbestäubung, indem ich die geöffneten Antheren auf die Narben der kastrierten Blüten rieb und die auf diese Weise bestäubten Blüten wieder mit Papierdüten abschloss. Später wurden Narben von kastrierten Blüten mit Pollen von anderen Blüten derselben Pflanze, andere mit Pollen von anderen Individuen derselben Art und noch andere mit Pollen von weiteren Kaffeearten bestäubt. Vierundzwanzig Stunden nach der Bestäubung erfolgte im Laboratorium auf die oben beschriebene Weise, die Untersuchung der abgeschnittenen Griffel, welche ergab, dass die Keimschläuche der Pollen fremder Blüten viel weiter in das Gewebe des Griffels eingedrungen waren als die der eigenen. Dabei konnte ein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit von Pollen anderer Blüten derselben Pflanze und der von anderen Individuen und anderen Arten nicht gefunden werden. Es war nun auch notwendig, zu untersuchen, ob die Keimschläuche der fremden Pollen auch eine frühere Befruchtung erwirkten als die der eigenen. Hierfür schnitt ich in Zeiträumen von 24 Stunden die Fruchtknoten der bestäubten,

kastrierten Blüten ab und fixierte sie, wonach die Untersuchung der durch Mikrotom geschnittenen und dann gefärbten Präparate vor sich gehen konnte. Diese Untersuchung ergab, dass der fremde Pollen schneller eine Befruchtung zu Stande bringt, als der eigene.

Tabelle I dient zur Veranschaulichung des Vorbeschriebenen.

Tabelle I.

Autogame Bestäubung.

Baum N^o. 15a, am 12 Mai dicht besetzt mit zahlreichen grossen Blütenknospen, die sich am nächsten Tage öffneten.

13 Mai	14 Mai	15 Mai	16 Mai	17 Mai	18 Mai	19 Mai	Resultat der mikroskopischen Untersuchung
5 Blüten morgens $\frac{1}{2}$ 7 Uhr bestäubt	fixiert	keine Befruchtung.
desgl. 7 Uhr bestäubt	fixiert	
desgl. $7\frac{1}{2}$ Uhr bestäubt	fixiert	
desgl. 8 Uhr bestäubt	fixiert	
desgl. $8\frac{1}{2}$ Uhr bestäubt	fixiert	
							1 Samenknospe befruchtet, bei 3 andere Pollenschläuche in der Mikropyle wahrnehmbar.
desgl. 9 Uhr bestäubt	fixiert	4 Samenknospen befruchtet, bei einer Pollenschläuche in der Mikropyle vorhanden.

Siehe Tabelle II, Seite 110.

Hieraus geht hervor, dass die Selbstbefruchtung erst 5 oder 6 Tage nach der autogamen, die Kreuzbefruchtung schon 3 oder 4 Tage nach der xenogamen Bestäubung stattfindet. Es ist einleuchtend, dass nicht immer präzise gesagt werden darf, die

Tabelle II.

Xenogame Bestäubung.

Baum 22, am 25 Mai mit zahlreichen grossen Blütenknospen dicht besetzt, die sich am nächsten Tage öffneten.

26 Mai	27 Mai	28 Mai	29 Mai	30 Mei	Resultat der mikroskopischen Untersuchung.
5 Blüten morgens $\frac{1}{2}$ 7 Uhr bestäubt.	fixiert	Keine Befruchtung.
desgl. 7 Uhr bestäubt	fixiert	„
desgl. $7\frac{1}{2}$ Uhr bestäubt	fixiert	2 Samenknospen befruchtet, bei 3 anderen Pollenschläuche in der Mikropyle vorhanden.
desgl. 8 Uhr bestäubt	fixiert	alle Samenknospen befruchtet.

Selbstbefruchtung findet nach 6 und die Kreuzbefruchtung nach 4 Tagen statt; es kommen immer kleine Schwankungen vor, die von der individuellen Verschiedenheit der Blüten bedingt werden. Immerhin ist das Durchschnittsresultat einer grossen Reihe von Beobachtungen, dass die Keimschläuche der fremden Pollen ungefähr doppelt so schnell durch den Griffel wachsen und bei der Eizelle ankommen, als die der eigenen Pollen. Hieraus könnte man vielleicht folgern, eine Fremdbefruchtung kommt zu Stande, wenn der fremde Pollen z. B. 2 Tage nach dem Öffnen der Blüte auf die Narbe fällt; dies ist aber niemals mit Sicherheit zu sagen und sogar in den meisten Fällen direkt zu verneinen. Die schon in der Knospe eine kleberige Flüssigkeit absondernden Narbenpapillen vertrocknen, wie ich mich überzeugen konnte, ziemlich schnell mit der Folge, dass die Pollenkörner nicht mehr keimen. Das Vertrocknen der Narbenpapillen geschieht nun bei der einen Blüte schneller als bei der anderen; solche individuellen Unterschiede kommen sogar bei Blüten ein und derselben Pflanze vor, weshalb es unmöglich

ist, die Grenze der Keimungsmöglichkeit oder -unmöglichkeit zu konstatieren.

Ausser aus dem vorhin genannten Grunde wird eine Kreuzbestäubung lange nach dem Öffnen der Blüte bei *Liberia*-Kaffee schon deshalb verhindert, weil die meisten Blüten bald nach dem Erblühen ihre Krone abwerfen und somit eins der wichtigsten, für die Insekten berechneten Lockmittel verlieren.

Die oben beschriebenen Versuche zeigen, dass die *Liberia*-Blüte, trotz ihrer regelmässigen Selbstbestäubung, einer Fremdbestäubung den Vorzug gibt. Für diese auf den ersten Blick etwas paradoxe Behauptung glaube ich eine Erklärung zu haben, die vielleicht der Wahrheit nahe kommen dürfte.

Die *Liberia*-Blüte war, nach ihrer ganzen Organisation zu urteilen, ursprünglich wahrscheinlich nur für xenogame Bestäubung eingerichtet. Vermutlich ist die Bestäubung durch Insekten nicht so sicher gewesen, um eine ausreichende Nachkommenschaft zu liefern, weshalb langsamerhand kleine Änderungen in der Organisation entstanden, die schliesslich eine Selbstbestäubung ermöglichten. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die *Liberia* in ihrem Vaterland noch jetzt ganz auf Kreuzbestäubung eingerichtet ist und die Blüten dort noch gar keine Einrichtungen zu einer Selbstbestäubung aufweisen, was bekanntlich von verschiedenen äusseren Faktoren, wie dem Vorkommen von bestimmten Insekten, Klima etc. abhängt. Unter den Rubiaceen kommen ähnliche Fälle vor, wo sich ursprünglich ganz auf Insektenbesuch eingerichtete Blüten später mehr und mehr der Selbstbestäubung anpassen und sogar soweit veränderten, dass sie sich schon im Knospenzustand bestäuben und abfallen. Ich erinnere hier nur an die Blüten von *Myrmecodia* ¹⁾.

1) Anschliessend möchte ich hier bemerken, dass von BURCK *Myrmecodia* als konstant kleistogam betrachtet wird. Der Beweis ist aber von BURCK niemals erbracht worden, dass die Blüten nur durch ihren eigenen Pollen befruchtet werden können. Solange dies nicht bewiesen ist, wäre es vielleicht besser, mit ULE von kleistopetalen Blüten zu sprechen. Vergl. hierzu die Arbeit BURCK's, Ueber Kleistogamie im weiteren Sinne und das Knight-Darwinsche Gesetz. — Ann. d. Jard. Bot. de Buitenzorg, Vol. VIII, 1890.

Die Fälle, wo deutlich zur Kreuzbestäubung eingerichtete Insektenblüten durch klimatische Verhältnisse übergegangen sind, sich autogam in der Knospe zu bestäuben, kommen nicht selten vor. So führt WARMING ¹⁾ ein lehrreiches Beispiel einer autogam in der Knospe bestäubten und dann nachträglich sich öffnenden Blüte in Grönland an, nämlich von der dort heimischen *Campanula uniflora*. Sonst existiert bei *Campanula*-Arten Proterandrie. Wahrscheinlich ist dieser Wechsel in der Bestäubungseinrichtung mit den Lebensbedingungen im hohen Norden in Zusammenhang zu bringen. Ob sie aber mit der Insektenarmut in Grönland in Verband steht, wie WARMING dies mit Vorbehalt annimmt, ist noch zweifelhaft. Auf diese Weise lässt sich vielleicht auch die Pseudokleistogamie der *Liberia*-blüte erklären. Eine diesbezügliche in der Heimat des *Liberia*-kaffees vorzunehmende Untersuchung dürfte mehr Klarheit verschaffen.

Die Frage, weshalb die Keimschläuche der eigenen Pollen nicht so gut im Griffelgewebe wachsen, ist natürlich schwer zu beantworten, und können wir hierüber nur Vermuten hegen. STRASBURGER ²⁾ stellt sich die Sache so vor, dass die Individualstoffe des Leitgewebes, wenn sie im Pollenkorn mit ihresgleichen zusammentreffen, in zu grossen Quantitäten vorhanden sind und das Maximum überschreiten, dass der Pollen ertragen kann. Während STRASBURGER also den eigenen individuellen Stoffen die Bedeutung von wachstumhemmenden Giften beilegt, betrachtet JOST ³⁾ sie als gleichgültige Stoffe und nimmt an, dass die individuellen Stoffe einer anderen Blüte wachstumangeregende Stimulantia sind. Man wird sich z. B. vorstellen können, dass die Pollenschläuche dieselben individuellen Stoffe besitzen wie das Leitgewebe der gleichen Blüten, und nur dann zu lebhaften Wachstum angeregt werden, wenn andersartige individuelle Stoffe in sie eindringen.

1) Om Bygningen og den formodede Bestøvningsmaade af nogle grønlandske Blømster. — Kjöbenhavn 1886. S. 52—53.

2) Ueber fremdartige Bestäubung. — Jahrb. f. Wiss. Botan., Bd. 17, 1886, S. 50.

3) Ueber die Selbststerilität einiger Blüten. — Botan. Ztg., Jahrg. 65, 1907, S. 111.

Jost sagt ferner hierüber „Welche von diesen Anschauungen auch zutreffen mag, soviel ist klar, dass die Mannigfaltigkeit der chemischen Zusammensetzung des Leitgewebes eine ungeheuer viel grössere sein kann, wenn Qualitätsdifferenzen anstatt Konzentrationsdifferenzen gegeben sind. Man denke nur an die Fülle von Isomeren, die eine Zuckerart mit vier asymmetrischen C-Atomen aufweist, und man wird sich sagen müssen, dass schon durch Stereoisomerie eines complizierten Eiweisstoffes Hunderte und Tausende von differenten Körpern entstehen können. Nimmt man dann noch etwas tiefer eingreifende Veränderungen im Molekül eines solchen Körpers vor, so steht man tatsächlich einer unbegrenzten Menge von immer noch sehr nahe verwandten Stoffen gegenüber“¹⁾).

Nachdem hier mitgeteilt wurde, dass die Blüten der *Liberia* neben der Selbstbestäubung noch eine Fremdbestäubung besitzen, muss die Frage beantwortet werden, ob eine solche Fremdbestäubung in der Natur häufig vorkommt. Zu diesem Zwecke stellte ich eine grosse Anzahl von Beobachtungen an und bin dabei zu der Anschauung gekommen, dass die Fremdbestäubung in der Natur häufiger vorkommt, als allgemein wohl angenommen wird. Wer eine Pflanzung mit blühenden *Liberia*-bäumen genau betrachtet, wird finden, das zwar die Zahl der Insekten im Verhältniss zur der grossen Anzahl von geöffneten Blüten sehr gering ist, die Insekten aber in sehr kurzer Zeit eine grosse Anzahl von Blüten nach Honig absuchen und dabei fremde Pollen auf die Narben bringen. Die Bienen z. B., die man in einem blühenden *Liberia*-Garten ja immer beobachten kann, sind sehr beweglich und halten sich nur kurze Zeit bei einer Blüte auf; sie fliegen hin und her, jetzt auf diesen dann wieder auf jenen Baum. Um ein Begriff zu bekommen, wieviel Blüten von Insekten in einer bestimmten Zeit nach Honig abgesucht werden, habe ich versucht, diese Menge in Zahlen auszudrücken. Früh am Morgen zählte ich an einer Anzahl Bäume die eben geöffneten Blüten und notierte genau, wieviel von

1) Meine Anschauung über diesen Punkt ist im Kapitel „Selbststerilität“ festgelegt worden.

diesen durch honigsuchende Insekten aufgesucht wurden. Erst auf diese Weise war es möglich genau festzustellen, wieviel Blüten annähernd in einer bestimmten Zeit mit fremder Pollen bestäubt werden ¹⁾. Ich lasse hier einige Zahlen folgen:

9 April.

Baum N^o. 8: Morgens früh 8 Uhr, 48 Blüten geöffnet; von Insekten in 15 Minuten besucht: 32 Blüten.

25 April.

Baum N^o. 7a: Morgens früh 8 Uhr, 72 Blüten geöffnet; von Insekten in 25 Minuten besucht: 48 Blüten.

14 Mai.

Baum N^o. 15: Morgens Früh 8½ Uhr, 64 Blüten geöffnet; von Insekten in 45 Minuten besucht: 52 Blüten.

14 Mai.

Baum N^o. 18b: Morgens ½10 Uhr, 32 Blüten geöffnet; von Insekten in 15 Minuten besucht: 24 Blüten.

Auf Grund meiner Untersuchungen auf dem Gebiete der Bestäubung und Befruchtung bei *C. liberica* vermute ich, dass die starke Variabilität bei dieser Art hauptsächlich die Folge der vielfachen Fremdbefruchtung ist.

Im Vorigen war schon kurz die Rede von dem schnellen Abfallen der *Liberia*-Blüten kurz nach ihrem Eröffnen, was nach Burck die Folge einer Befruchtung ist. Die Untersuchung hat aber die Unabhängigkeit dieser Erscheinung von der Befruchtung hinreichend gelehrt. Es wurde eine grosse Anzahl Fruchtknoten von Blüten untersucht, deren Kronen kurz nach dem Erblühen abgefallen waren; die mikroskopische Untersuchung ergab, dass in keinem Falle eine Befruchtung stattgefunden hatte. Übrigens war dieses Resultat wohl von Vornherein zu erwarten, da, wie schon oben mitgeteilt, die Befruchtung nicht so kurz nach der Bestäubung eintritt. Es wäre auch gar nicht zu verstehen, warum die Krone allein abfällt und der Griffel immer noch stehen bleibt, während doch nach einer wirklich stattgefundenen Befruchtung der Griffel vertrocknet und abfällt.

1) Natürlich wurden einigen Insekten daraufhin untersucht, ob Pollenkörner an ihrem Körper haften.

Die Untersuchung der Griffel von Blüten, deren Kronen kurz nach dem Öffnen abgefallen waren, wies in den stehengebliebenen Griffeln Pollenschläuche nach, sodass das schnelle Abfallen der Blütenkronen wahrscheinlich mit vollzogener Bestäubung zusammenhängt. Diese findet, wie wir gesehen haben, auf jeden Fall schon in der Knospe statt.

Versuche, dass schnelle Abfallen der Krone durch Verhinderung der Bestäubung zu beeinflussen, hatten kein Resultat, was aber noch nicht beweist, dass diese Erscheinung von der stattgefundenen Bestäubung unabhängig ist. Die inneren correlativen Vorgänge, die hier jedenfalls eine grosse Rolle spielen, können in zahllosen Generationen von äusseren Bedingungen dermassen beeinflusst sein, dass ein plötzlicher Wechsel dieser Bedingungen die Vorgänge wenig umzugestalten im Stande ist. In einer früheren Mitteilung ¹⁾ über diesen Gegenstand, nannte ich die inneren Bedingungen autonom, also von der Aussenwelt unabhängig. Dieser Ausdruck „autonom“ ist wenig glücklich gewählt. Bekanntlich versteht PFEFFER ²⁾ unter autonomen Erscheinungen solche, die auf erblich überkommenen, inhärenten Eigenschaften beruhen und durch Veränderungen in den Aussenbedingungen nicht modifiziert werden, was bei den autio-nomen wohl der Fall ist. Mit Recht hebt KLEBS ³⁾ hervor, dass der Begriff des Autonomien unzulänglich ist und deshalb nicht richtig, weil es tatsächlich keinen Vorgang gibt, der nicht durch die Aussenwelt verändert werden könnte. Die Abhängigkeit ist nur je nach der Spezies in sehr verschiedenem Grade ausgesprochen.

Über die Bestäubung der anderen Kaffee-Arten ist folgendes zu sagen: Wie bei *C. liberica* sind auch die Blüten der anderen *Liberia*-ähnlichen Arten eingerichtet, also *C. abeokuta*, *C. exelsa* etc., bei denen ebenfalls schon eine Selbstbestäubung im Knospenzustand stattfindet. Auch bei diesen Arten wächst der fremde Pollen schneller durch den Griffel als die Keimschläuche

1) Een en ander over de biologie der koffiebloom. *Teysmannia*, N^o. 9, 1910.

2) Pflanzenphysiologie, 2 Aufl., Bd. II, Leipzig, 1901, S. 161.

3) Ueber Probleme der Entwicklung. — *Biolog. Centralbl.*, Bd. 44, 1904, S. 291.

der eigenen, weshalb daher auch in der Natur häufig Fremdbestäubung zu Stande kommt.

C. Laurentii (*C. robusta*) hat im Grunde denselben Bau der Blüte wie *C. liberica*, die kleineren Unterschiede in der Organisation aber, die erst bei näherer Untersuchung auffallen, sind für die Bestäubung von grosser Bedeutung.

Selbstbestäubung im Knospenzustand findet bei *C. Laurentii* (*C. robusta*) gar nicht oder selten statt und zwar aus den folgenden Gründen:

Die Narbenlappen kommen in der Knospe wohl mit den Antheren in Berührung, doch sind die beiden Lappen dann noch geschlossen, sodass die Pollenkörner nur schwierig auf die Narbenpapillen gelangen können. Nach dem Erblühen sind die beiden Narbenlappen geöffnet und wird eine Selbstbestäubung zu Stande kommen, wenn die geöffneten Antheren mit den Narbenlappen in Fühlung kommen.

Ausser dieser Eigentümlichkeit der Blüte sind auch grosse Unterschiede in der Länge der Griffel zu konstatieren. An einem und demselben Baume kommen sowohl Blüten mit gleich langen Antheren und Griffeln als auch solche vor, deren Griffel viel länger als die Antheren sind. Man könnte hier also von einer Art Heterostylie sprechen, obwohl die Antheren nicht wie bei der wirklichen Heterostylie verschieden lang sind. Ein Unterschied in der Grösse der Pollenkörner der Blüten mit kurzen und mit langen Griffeln, war ebenso wenig zu konstatieren.

Unter den Rubiaceen kommen viele Gattungen mit echter Heterostylie vor, weshalb es mir nicht ausgeschlossen erscheint, dass sich auch unter den *Coffea*-Arten langsam echte Heterostylie entwickeln kann, sobald sie für die Pflanze von Vorteil ist.

Die Blüten von *C. Laurentii* (*C. robusta*), deren Antheren und Griffel gleich lang sind, können sich nur dann selbst bestäuben, wenn die Antheren mit den Narbenlappen in Berührung kommen, was nicht selten der Fall ist. Bei langgriffeligen Blüten kann nur eine Fremdbestäubung stattfinden.

In Blüten mit langen Griffeln hat dieses Organ häufig eine

eigentümliche Knospenlage. In der Knospe ist der lange Griffel zickzack- oder spiralartig gedreht, denn nur auf diese Weise hat er in der Knospe Platz. Nach dem Erblühen streckt sich der Griffel, der bereits in der Knospe seine definitive Länge erreicht hat, und weist nur mehr kleine Anzeichen seiner einstigen knospenlage auf.

Ein Rückblick über die verschiedenen Methoden, mit deren Hülfe die Blüte von *C. Laurentii* (*C. robusta*) eine Selbstbestäubung verhindert, macht es erklärlich dass in der Natur bei dieser Art hauptsächlich eine Fremdbestäubung in Frage kommt.

Die grosse Anzahl von Blüten bei *C. Laurentii* (*C. robusta*), die dicht gedrängt zusammensitzen, macht die Arbeit des Honigsuchens und damit auch die Fremdbestäubung ausserordentlich leicht.

Auf die oben beschriebene Weise findet auch die Bestäubung bei den anderen zu der Gruppe von *C. Laurentii* gehörenden Arten, also bei *C. uganda*, *C. canephora* etc., statt.

Eine Ausnahme scheint dagegen *C. quillouensis* zu machen, bei der ein grosser Unterschied in der Länge der Griffel bei den einzelnen Blüten eines Baumes nicht gefunden werden konnte. Dagegen waren an den untersuchten Bäumen Blüten von verschiedener Grösse vorhanden. Ich fand Blüten, die sich sicher selbst bestäuben, da ihre Antheren konstant über die Narben gebogen waren, sodass Pollen leicht auf die Narbenlappen fallen konnte. Auch bei den grossen Blüten kann eine Selbstbestäubung leichter eintreten als bei den Blüten der *C. Laurentii* (*C. robusta*), da, wie ich mich überzeugte, die Antheren leicht mit den Narben in Berührung kommen. Ob diese Merkmale der Blüten aber konstant für diese Art sind, will ich nicht behaupten.

PHYSIOLOGISCHE VERSUCHE AN POLLENKÖRNERN.

Über Keimung und Lebensdauer der Pollenkörner des Kaffeebaumes sind in der Litteratur fast gar keine Angaben vorhan-

den. Nur ZIMMERMANN ¹⁾ giebt einige kurze fragmentarische Notizen über den Einfluss von äusseren Faktoren auf die Keimung und Lebensdauer der Pollenkörner, betont aber gleichzeitig schon die Notwendigkeit eingehender Untersuchungen auf diesem Gebiete. Diese Gründe haben mich veranlasst der Frage der Keimung und Lebensdauer der Pollenkörner näher zu treten.

a. Über die Keimung der Pollenkörner und das Wachstum der Keimschläuche in künstlicher Nährlösung.

Die von DE JUSSIEU und NEEDHAM ausgesprochene Ansicht, von der Schädlichkeit des Wassers für die Pollenkörner der Pflanzen, wurde bereits von VAN TIEGHEM ²⁾ widerlegt, der nachwies, dass es eine grosse Anzahl von Pflanzen gibt, deren Pollenkörner nicht allein in Wasser nicht platzen, sondern sogar normalerweise Keimschläuche bilden. Später hat dann RITTINGHAUS ³⁾ die Widerstandsfähigkeit des Pollens gegen äussere Einflüsse eingehend behandelt.

Es war mir nun zunächst darum zu tun, die Pollenkörner der Kaffee-Arten auf ihre Keimfähigkeit hin in verschiedenen Medien zu untersuchen.

ZIMMERMANN berichtet, dass nach seinen Erfahrungen die Pollenkörner von *C. liberica* in Regenwasser gut keimen und schöne Schläuche treiben, diese allerdings kräftiger wachsen, wenn zu dem Wasser ein Stückchen der Narbe gefügt wurde, was besonders der Fall ist, wenn statt Regen- destilliertes Wasser in Anwendung kam. Diese Angaben von ZIMMERMANN kann ich bestätigen.

Ausser Wasser habe ich dann noch die verschiedensten Medien untersucht, um zu sehen wie sich die Keimung der Pollenkörner verhält. Die Erfahrungen dieser Untersuchungen waren

1) L. c. S. 97.

2) Recherches physiologiques sur la vegetation libre du pollen et de l'ovule. — Ann. d. Sc. nat., Bot., 5 Sér. t. XII, 1872.

3) Ueber die Widerstandsfähigkeit des Pollens gegen äussere Einflüsse. Inaugural-Dissertation, Bonn 1878.

mir später bei der Prüfung der Frage nach der Lebensfähigkeit von grossem Wert.

Rohrzucker:

In Rohrzuckerlösung keimen die Pollenkörner der verschiedenen Kaffee-Arten sehr gut; einen Unterschied in der Keimfähigkeit der einzelnen Arten habe ich nicht konstatieren können. Stets wurde für die Lösung destilliertes Wasser genommen und die Kulturen in feuchter Kammer angesetzt. Gewöhnlich beginnt die Keimung in den Zuckerlösungen schon innerhalb einer halben Stunde. Der Konzentrationsgrad, in welchem die Pollenkörner noch zur Keimung gelangen, liegt etwa bei 40 und 45 ‰, während der optimale bei 20 ‰ liegt. Beim optimalen Konzentrationsgrad wachsen die Schläuche sehr schnell und erreichen auch bald ihre grösste Länge, während die Keimung bei höherer Konzentration der Zuckerlösung immer später eintritt und die Schläuche kürzer bleiben. Bei 40 ‰ Lösung tritt die Keimung erst nach mehreren Stunden ein und die Schläuche bleiben sehr kurz und sind obendrein stark gekrümmt; das Plasma weist ein krankhaftes schaumiges Aussehen auf.

Ein Unterschied in der Keimungsgeschwindigkeit an im Licht oder im Dunklen aufbewahrten Pollenkörnern in den Lösungen war nicht zu beobachten.

Kultur auf festen Nährböden.

Bekanntlich wird das Wachstum und die Keimung der Pollenkörner in tiefen Flüssigkeiten sehr behindert, wahrscheinlich weil den Körnern zu wenig Sauerstoff zur Verfügung steht. Bereits KNY¹⁾ fand, dass ein Zusatz von Gelatine und MANGIN²⁾ dass Agar-Agar die Keimung und das Wachstum sehr förderten. Auf diese Weise ging man dazu über, die Keimung auf festen Nährböden zu studieren, was natürlich die Beobachtung sehr erleichterte. Gelatine als Zusatz zur Zuckerlösung kommt für

1) Sitzungsberichte des Botan. Ver. der Prov. Brandenburg, XXIII, Sitz. von 12 Juli 1881.

2) Recherches sur le pollen. Bull. de la Soc. Botan. de France, t. XXXIII, 1886, S. 337.

die Tropen natürlich nicht in Betracht, dagegen erwies sich Agar Agar als ein vorzügliches Mittel, die Pollenkeimung auf festen Nährböden zu studieren. Die Versuche mit durch Agar festgemachten Lösungen wurden in derselben Weise durchgeführt, wie Jost¹⁾ dies für seine Versuche mit Pollenkörnern beschrieben hat:

„Alle Versuche mit durch Agar festgemachten Lösungen wurden in der Weise durchgeführt, dass die Kulturtropfen in einer Ausdehnung von etwa 4 cm. auf lange Objektträger gegeben wurden, worauf dann quer durch die Mitte des erstarrten Tropfens mit der Platinöse ein Impfstrich mit Pollen gemacht wurde. Dann kamen die Objektträger in eine feuchte Kammer. Das Wachstum ist unter diesen Bedingungen bequem mit blossem Auge und mit dem Massstab zu verfolgen.“ Diese Methode hat mir bei meinen Untersuchungen sehr gute Dienste geleistet.

Bei dieser Versuchsanstellung handelte es sich zunächst darum die Konzentration des Agars zu ermitteln. Hierbei ergab sich, dass ein 1% Agar-zusatz zur Zuckerlösung am vorteilhaftesten ist. Die optimale Konzentration des Zuckers bei diesen festen Nährböden liegt bei 20%.

Um zu sehen, ob andere Kohlenhydrate als der Rohrzucker, denselben günstigen Einfluss auf die Keimung und das Wachstum der Pollenkörner ausüben, probierte ich nacheinander Traubenzucker, Milchzucker, Dextrose und Arabinose, mit dem Resultat, dass der Traubenzucker fast den gleichen Einfluss auszuüben scheint als der Rohrzucker, während die anderen Kohlenhydrate, weit hinter ihnen zurückbleiben. Nun ist es aber noch immer möglich, dass diese schlechtere Keimung auf das Konto der beliebigen Konzentration der in Anwendung gekommenen Kohlenhydrate zu setzen wäre. Darum wurde mit Milchzucker ein Versuch mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt; es kamen zur Verwendung Konzentrationen von 10, 5, 2½, 1, ½, 0,25% mit 1% Agar, während gleichzeitig

1) L. c., S. 101.

Kontrollversuche mit Rohrzucker angestellt wurden. Es zeigte sich dabei, dass bei $2\frac{1}{2}\%$ Milchzucker die Schläuche am längsten wurden, ihre Länge aber doch nicht mit denjenigen auf $2\frac{1}{2}\%$ Rohrzucker mit 1% Agar zu vergleichen war.

Kalialpeter:

0.1% Lösung schien bereits für die Pollenkörner sehr schädlich zu sein. Es keimten sehr wenig Körner und die meisten platzten schon nach einigen Stunden. Schwächere Konzentrationen erwiesen sich auch als giftig, obwohl z. B. in einer 0.01% Lösung etwa eine Keimung von 10% zu konstatieren war. Ein Platzen der Körner konnte nach 11 Stunden noch nicht beobachtet werden, die Körner waren dagegen bereits alle dunkelbraun gefärbt.

Kochsalz:

In einer 0.1% Lösung keimten die Pollenkörner noch verhältnissmässig gut; bei einer Konzentration von 0.2% konnte aber schon Platzen der Körner konstatiert werden.

Organische Säuren:

MOLISCH¹⁾ gibt für gewisse Pollenarten an, dass sie durch organische Säuren, besonders Äpfelsäure, zum Keimen angeregt werden, weshalb ich versuchte die Keimung durch Zusatz von Äpfelsäure zu beschleunigen. Die Versuche mit verschiedenen Konzentrationen, z. B. 0.002% , wiesen keine Beschleunigung auf, während höhere Konzentrationen die Keimung direkt hemmten,

Proteinstoffe:

Wie schon oben bemerkt liegt das Optimum der Keimung der Pollenkörner in Zuckerlösung etwa bei 20% und die Grenze der Keimungsfähigkeit bei 30 und 40% . Eine Zugabe von Proteinstoffen (Pepton und Hühnereiweiss) beschleunigte die Keimung wohl etwas, hatte aber übrigens sonst gar keine weitere günstige Reizwirkung. Diese Versuche habe ich deshalb

1) Zur Physiologie des Pollens, mit besonderer Rücksicht auf die chemotropische Bewegungen der Pollenschläuche. — Sitzungsber. d. Math. Nat. Classe d. Akad. d. Wiss., Wien, Abt. I, 1893, S. 423.

ausgeführt, weil bekanntlich von LIDFORSS ¹⁾ für viele Pollenarten eine günstige Beeinflussung durch Zusatz von Proteinstoffen konstatiert worden war. Allerdings handelte es sich bei den Versuchen von LIDFORSS stets um Pollen, die in Wasser nicht zum Keimen zu bringen waren oder schon in Zuckerlösungen niederer Konzentration zu Grunde gingen, was, wie wir gesehen haben, bei den Pollen der Kaffeearten nicht der Fall ist.

b. Über den Einfluss von äusseren Faktoren auf die Lebensdauer des Pollens.

Die Lebensdauer des Pollens ist im Allgemeinen von äusseren Faktoren sehr abhängig. Untersuchungen auf diesem Gebiete sind im grösseren Umfange verhältnismässig selten angestellt worden und doch sind solche Beobachtungen nicht allein in biologischer Hinsicht, sondern auch für praktische Hybridisationsversuche von besonderem Wert. Wenn wir hier kurz der Übersicht halber die Litteratur auf diesem Gebiete durchgehen, so finden wir, dass, von unsicheren Schriften des Altertums abgesehen, KÄMPFER ²⁾ der erste war der sich mit der Lebensdauer des Pollens beschäftigte und zwar mit demjenigen von *Phoenix dactylifera*. Nach ihm waren es GLEDITSCH ³⁾, KÖLREUTER ⁴⁾, (GÄRTNER ⁵⁾, HOFFMAN ⁶⁾, MANGIN ⁷⁾, RITTINGHAUS ⁸⁾, MOLISCH ⁹⁾ und JOST ¹⁰⁾, die sich dieser Frage zuwandten. Diese Forscher haben aber alle dem Einfluss der Luftfeuchtigkeit keine besondere

1) Zur Biologie des Pollens. — Jahrb. für Wiss., Botan., Bd. 29, S. 1.

2) Amoenitates exoticae etc. Lemgoviae 1712. S. 708. Nach Citat bei PFUNDT.

3) Physikalische Belustigungen, Berlin 1751, S. 81. Ebenfalls nach PFUNDT.

4) Historie der Versuche etc. Cameri Opuscula botanici argumenti 1787, S. 165, (nach PFUNDT).

5) Die Befruchtungsorgane der vollkommenen Gewächse. Stuttgart 1844, S. 144, nach PFUNDT.

6) Zur Geschlechtsbestimmung. Botan. Ztg., 1871, S. 97.

7) L. c. S. 337.

8) L. c. S. 123.

9) L. c.

10) Zur Physiologie des Pollens. — Ber. d. deutsch. Bot. Ges., 1905, Bd. 23, S. 504, L. c. S. 77.

Beachtung geschenkt und doch sind gerade solche Versuche, noch dazu in den Tropen, wo die Luftfeuchtigkeit eine so grosse Rolle spielt, von besonderem Interesse. Der einzige der sich mit dem Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf verschiedene Pollenarten beschäftigte, ist PFUNDT¹⁾ gewesen, der in einer schönen ausführlichen Arbeit die Resultate seiner Untersuchungen wiedergibt. Natürlich hat dieser Forscher sich hauptsächlich mit Pflanzen der gemässigten Zone befasst, da er keine Untersuchungen in den Tropen zu machen im Stande war. Es schien mir aus diesem Grunde nicht überflüssig solche Untersuchungen konsequent an einer Pflanze durchzuführen, und ich wählte als Versuchsobjekt die Kaffeepflanze. Die Versuchsanstellung geschah in derselben Weise wie PFUNDT sie angegeben hat, und wie sie sich für die hiesigen Verhältnisse auch durchaus bewährte.

Da für die im folgenden zu beschreibenden Versuche sehr viel Material an Pollen nötig war und immer nur frische Pollen von eben geöffneten Blüten zur Verwendung kamen, habe ich das Material auf folgende Weise gesammelt. Blüten, deren Erblühen für den nächsten Morgen bevorstand, wurden am Abend vorher in Gazesäckchen eingebunden. Am nächsten Morgen habe ich diese Säckchen geöffnet, die Zweige mit den geöffneten Blüten abgeschnitten und möglichst schnell in das Laboratorium gebracht, wo dann der Blütenstaub durch einfaches Schütteln der Blüten über Papier gewonnen wurde. Auch versuchte ich die Blütenzweige schon am vorigen Abend vom Baume abzuschneiden und sie dann im Laboratorium in Wasser zu stellen; auf diese Weise gelang es manchmal Blütenstaub zu gewinnen, allein es öffnen sich die Blüten im Zimmer nicht immer regelmässig, ja viele überhaupt nicht, sondern fallen geschlossen ab.

Der gesammelte Blütenstaub wurde ordentlich gemischt, da der verschiedener Blüten nicht einander gleichwertig ist, was bereits alle Forscher die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, konstatierten. Das Mischen der Pollenkörner war übrigens nicht

1) Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Lebensdauer des Blütenstaubes. Pringsheim's Jahrb. f. Wiss. Bot., Bd. 47, 1910.

schwierig, denn der Pollen des Kaffees besitzt keine grosse Unebenheit auf der Oberfläche.

Den aus den Blüten gesammelten und gut vermischten Blütenstaub habe ich in Tüten von Papier aufbewahrt.

Zur Erzielung verschiedener Feuchtigkeitsgehalte kamen verschiedene Dampfspannungen zur Anwendung. Natürlich handelte es sich bei den Versuchen immer nur um die relative Luftfeuchtigkeit, da diese allein für die Pflanze von Bedeutung ist. Die konstanten Dampfspannungen wurden nach der Methode PFUNDT's in Exsikkatoren über Schwefelsäuregemische erhalten. Es kamen Dampfspannungen von 30, 60 und 90% zur Anwendung. Da diese Dampfspannungen bereits von dem vorhin genannten Forscher empirisch ermittelt worden waren, nachdem er für die Dampfspannung von 60% den Gehalt des Gemisches an H_2SO_4 aus den Landoltschen Tabellen festgestellt hatte, habe ich mir die Arbeit in soweit erleichtert, indem ich diese Zahlen gleich verwandte.

Für eine Dampfspannung von 30% beträgt der Gehalt an Schwefelsäure 15,14%, von 60%, 37,69%, von 90%, 54%. Eine sehr niedrige Dampfspannung ermöglichte sich dadurch, dass sich der Blütenstaub in Exsikkatoren über konzentrierter Schwefelsäure und Chlorcalcium befand. Die Exsikkatoren wurden, zur Erzielung einer möglichst konstanten Temperatur, in ein dunkles Zimmer von annähernd konstanter Temperatur von 28° gebracht.

Die Lebensdauer der den verschiedenen Dampfspannungen ausgesetzten Pollen, konnte dann durch Aussaat auf Rohrzuckeragar (Rohrzucker 20%, Agar 1% und ausgelaugt) festgestellt werden. Als Kulturgefäße kamen sterilisierte feuchte Kammern in Anwendung. Die Deckgläschen wurden mit dem sterilisierten Rohrzucker-Agar beschickt und nachdem in die Vertiefung des Objektträgers ein Tröpfchen Zuckerlösung derselben Konzentration gebracht war, mit Vaseline fest auf den Objektträger geklebt. Die Kulturen kamen dann im dunklen Zimmer bei annähernd konstanter Temperatur zur Aufstellung. Eine Änderung der Dampfspannung innerhalb der Kammern und hier-

mit eine Konzentrierung der Tropfen war auf diese Weise vermieden.

Sämtliche, mir hier in Buitenzorg zur Verfügung stehende Arten von Kaffeepollen, erfuhren eine Prüfung ihrer Lebensdauer; die Pollen wurden Tag für Tag auf ihre Keimfähigkeit hin untersucht.

Nachstehende Tabelle giebt eine Übersicht der angestellten Versuche:

NAME	Lebensdauer in Tagen				über H ₂ SO ₄
	In lufttrock- nem Zustande	Dampfspannung			
		90%	60%	30%	
<i>C. liberica</i>	5	2	4	7	8
<i>C. arabica</i>	5	5	6	10	10
<i>C. Laurentii</i> (robusta) .	2	2	4	8	10
<i>C. abeokuta</i>	3	1	4	6	8
<i>C. excelsa</i>	4	4	5	7	7
<i>C. uganda</i>	3	1	4	8	10
<i>C. Dewevrei</i>	4	2	4	6	7
<i>C. quillou</i>	4	1	5	10	12

Aus der Tabelle geht die Abhängigkeit der Lebensdauer des Pollens von dem Feuchtigkeitsgehalt der Luft deutlich hervor. Dasselbe Resultat hat übrigens auch PFUNDT für eine grosse Anzahl von Pollenarten feststellen können. Diese Versuche lassen es erklärlich erscheinen, weshalb man z. B., wie KÄMPFER mitteilt, den Pollen der Dattelpalme an einen trockenen und luftigen Ort bringt, wenn man ihn längere Zeit lebensfähig erhalten will. Aus den Versuchen an Kaffeepollen geht hervor, dass man es in der Gewalt hat den Pollen länger keimfähig zu erhalten als es sonst in der Natur der Fall wäre.

In der Natur haben wir nicht mit konstanten Dampfspannungen zu tun, sondern ist der Pollen grossen Schwankungen des Feuchtigkeitsgehaltes der Luft ausgesetzt, die hier in Buitenzorg oft sehr bedeutende sein können. In der Trockenzeit sinkt die Luftfeuchtigkeit an heissen Vormittagen oft bedeutend, während sie Nachmittags nach dem Einsetzen der starken Regen bis zum Sättigungspunkt steigt. Auch zur Regenzeit

pflegt der Vormittag meist trocken und sonnig zu sein. Natürlich spielt auch der Wind bei dem Austrocknen des Pollens eine grosse Rolle. Ein weiterer grosser Faktor ist in dem Einfluss der vorübergehenden Benetzung und Austrocknung auf die Befruchtungsfähigkeit des Pollens zu berücksichtigen. Dass der Kaffeepollen der Gefahr des Benetzung ausgesetzt ist, unterliegt gar keinem Zweifel. Man braucht sich nur die Blüte des Kaffeebaumes anzusehen, um zu bemerken, dass der Pollen ganz ungeschützt ist. Diese exponierte Lage ist aber für die Pollenkörner keine grosse Gefahr, da wie wir wissen der Pollen in Wasser nicht nur nicht abstirbt, sondern sogar sehr schön zu keimen im Stande ist.

Um Klarheit zu bekommen, ob der Wechsel in Benetzung und Austrocknen auf die Pollenkörner eine schädliche Wirkung ausübt, habe ich einige Versuche angestellt, deren Resultate hier mitgeteilt seien.

Es wurden Pollenkörner in einem Uhrschildchen stark angefeuchtet und dann sofort in die Sonne ausserhalb des Laboratoriums gebracht, wo das Wasser schnell verdunstete. Bei dieser Behandlung des Pollens zeigte sich, dass eine grosse Anzahl von Pollenkörnern im Wasser bereits Keimschläuche getrieben hatten, die aber beim Austrocknen rasch zu Grunde gegangen waren; die noch nicht gekeimten Körner keimten nach dem Austrocknen sehr schlecht.

Da Versuche mit Uhrschildchen deshalb nicht genügten, weil man es nicht in der Gewalt hat, die Benetzung eine bestimmte Zeit auf die Körner einwirken zu lassen und die Benetzungsdauer, wie aus den Versuchen von PFUNDT hervorgeht, sehr wichtig für die Befruchtungsfähigkeit nach dem Austrocknen ist, habe ich die Versuche so angestellt, wie PFUNDT sie in seiner Arbeit angegeben hat. Die Pollen kamen in Kapseln von Fliesspapier, wurden darauf eine bestimmte Zeit in destilliertes Wasser getaucht und dann nach möglichst intensivem Abtrocknen zwischen Fliesspapier über Chlorcalcium gebracht. Wie untenstehende Tabelle zeigt, hat die Dauer der Benetzung auf die Lebensdauer des Pollens einen grossen Einfluss, abgesehen davon, dass das

Austrocknen nach Benetzung an sich schon sehr schädlich wirkt.

NAME	Dauer der Benetzung in Minuten	Lebensdauer des Pollen in Tagen	
		des Benetzten, über Chlorcalcium	des nicht Benetzten, über Chlorcalcium
<i>Coffea liberica</i>	5	5	9
» »	10	4	8
» »	30	1	8
» »	60	0	8

c. Einfluss des Alters auf die Keimfähigkeit:

Zuletzt wurde noch das Alter der Pollenkörner auf ihre Keimfähigkeit hin geprüft, mit dem Resultat, dass frische Pollen viel schneller, als einige Tagen über konzentrierter Schwefelsäure bewahrte Pollen keimen. Beachtenswert, aber weiter nicht verwunderlich und bereits bei verschiedenen anderen Pollenarten beobachtet, ist die Tatsache, dass der Pollen des Kaffeebaumes, je älter er ist, um so grössere Anforderungen an seinen Nährboden stellt. Frische Pollen keimen, wie bereits mitgeteilt wurde, in Wasser, während etwas ältere darin viel schlechter keimen als in Rohrzuckerlösung.

ÜBER PARTIELLE STERILITÄT BEIM KAFFEE.

In einer kurzen Mitteilung ¹⁾ habe ich bereits auf die Sterilität des Kaffeebaumes hingewiesen. Im Folgenden seien die Untersuchungen auf diesem Gebiete ausführlich mitgeteilt.

Über Sterilität bei Arten der Gattung *Coffea* sind in der wissenschaftlichen Litteratur gar keine Angaben vorhanden. Den Kaffeepflanzern ist dagegen diese Erscheinung schon lange bekannt und finden sich auch diesbezügliche Angaben in den praktischen Zeitschriften.

Bei *Coffea arabica* kommt es nicht so selten vor, dass sich

1) L. c., S. 17.

statt zwei Samen nur einer entwickelt hat, während der andere gänzlich abortiert ist. Diese Erscheinung tritt nicht immer regelmässig an den Bäumen auf, so findet man neben Bäumen mit sehr vielen Früchten und nur wenig guten Samen solche, mit sehr vielen guten Samen.

Bei *C. liberica* ist die Sterilität weniger häufig als bei der vorhin genannten Art; ich bin auf Grund meiner Untersuchungen zu der Anschauung gelangt, dass ihre Sterilität im Verhältniss sehr gering ist.

Bei den auf Java im Grossen kultivierten Hybriden ist die Sterilität eine sehr häufige Erscheinung. Man findet in einer Pflanzung nicht selten Bäume, die Tausenden von Früchten tragen, während nur wenige gute Samen geerntet werden. Auf die vermutlichen äusseren Ursachen dieser partiellen Sterilität komme ich in einem besonderen Kapittel noch zurück.

In meiner vorläufigen Mitteilung habe ich als direkte Ursache der Sterilität folgende drei Punkte festgehalten:

- a. Das Degenerieren des weiblichen Sexualapparates.
- b. Das Degenerieren des männlichen Sexualapparates.
- c. Das Nichtwachsen der Pollenschläuche durch den eigenen Griffel und die dadurch verhinderte Befruchtung der Eizellen. (Selbststerilität).

Im Nachfolgenden werde ich versuchen die beiden erstgenannten Punkte in cytologischer Hinsicht zu prüfen und behalte mir vor, den dritten, der von physiologischer Bedeutung ist, später noch eingehend zu behandeln.

Cytologische Untersuchung.

- a. Degeneration des weiblichen Sexualapparates.

Die Degeneration des weiblichen Sexualapparates kann, wie ich mich an zahlreichen Präparaten überzeugt habe, zu verschiedenen Zeiten eintreten, entweder schon sehr früh, wenn sich der Mutterzelle im Synapsisstadium befindet, oder auch erst viel später, nach der Tetradenteilung; auch geht die Entwicklung des Embryosacks noch normal vor sich und die Degeneration tritt erst bei der Bildung der Eizelle auf, was

aber verhältnissmässig selten der Fall ist. Betrachten wir die Degeneration im frühesten Stadium, also im Synapsisstadium der Embryosackmutterzelle, so finden wir, dass sich das Plasma der Zelle stark kontrahiert hat und gleichmässig stark färbt. Diese früh einsetzende Degeneration des weiblichen Sexualapparates habe ich nur selten gefunden. Viel häufiger sind Bilder von degenerierenden Zellen im Stadium der Tetradenteilung zu beobachten.

Wie früher schon hervorgehoben, sind es die drei unteren nackten Zellen die normalerweise degenerieren. In diesem Stadium sehen wir, dass die vierte, zum eigentlichen Embryosack bestimmte Zelle ebenfalls degeneriert, indem sie unter starker Schrumpfung und Tingierung des Plasmas verkümmert (Taf. X, Fig. 59). Manchmal weist der Kern dieser Zelle schon Anzeichen einer Degeneration auf, noch ehe die anderen drei Zellen zu Grunde gegangen sind, also zu einem Zeitpunkt, wo die Chromosomen noch nicht in das ruhende Stadium übergangen. Die Anzeichen einer Verkümmernng des Kernes bestehen darin, dass das Chromatin sehr spärlich vertreten ist und der Nukleolus eine oder mehrere Vakuolen besitzt.

Die umgebenden Nucelluszellen verdrängen die drei unteren Tetradenzellen nicht normalerweise, sondern bleiben im Wachstum stillstehen, die Schrumpfung des Plasmas der Tetradenzellen schreitet schnell vorwärts, sodass zuletzt nur noch ein dunkler Streifen Plasma innerhalb eines Hohlraumes liegt. Ähnliche Degenerationsstadien des weiblichen Sexualapparates haben unter anderen TISCHLER¹⁾ und GEERTS²⁾ erwähnt.

In zwei Präparaten fand ich die Degeneration des weiblichen Apparates erst, nachdem der Embryosack fertig ausgebildet war und bereits eine Eizelle existierte. In diesen beiden Fällen war es vor allem die Eizelle, welche deutliche Anzeichen einer

1) Entwicklung der Sexualorgane bei einem sterilen *Bryonia*-Bastard. — Ber. d. Deutschen Botan. Ges., Bd. XXIV, Heft 2, 1906, S. 94.

2) Beiträge zur Kenntnis der Cytologie und der partiellen Sterilität von *Oenothera Lamarckiana*. — Dissertation Amsterdam, 1909; vergl. auch Recueil des Travaux Botan. Néerlandais., Vol. 5, S. 93.

Verkümmerung zeigte. Das Plasma war zusammengeschrumpft und stark tingiert, der Kern in unregelmässige Chromatinklumpen zerfallen, die unregelmässig im Plasma zerstreut lagen. In diesen Präparaten zeigten obendrein die anderen Zellen, Synergiden und Antipoden, eine auffallende Plasmaarmut, während das Plasma des Embryosacks stark vakuolisiert erschien.

b. Degeneration des männlichen Sexualapparates.

Die Sterilität des männlichen Sexualapparates ist cytologisch genauer zu verfolgen und weicht erheblich von dem normalen Gang der Bildung der Pollenkörner und der Tapetenzellen ab.

Wie früher schon betont wurde, entstehen aus der Urmutterzelle 4, 5 oder 6 Mutterzellen. Es kommt nun nicht selten vor, dass eine oder mehrere dieser Mutterzellen bald nach ihrer Entstehung zu Grunde gehen und gänzlich von den anderen verdrängt werden (Taf. XI, Fig. 66 und 67).

Die Degeneration findet nicht allein nach der Entstehung der Mutterzellen statt, sondern ich fand sie auch, und zwar meist erst später, bei der Bildung der Spezialzellen. Dies lehrt also, dass ebenso wie bei der Verkümmerung des weiblichen, die Degeneration des männlichen Apparates zeitlich verschieden eintreten kann.

Betrachten wir nun das früheste Stadium der Degeneration genauer, so finden wir, dass nach der Teilung der Urmutterzelle in die Mutterzellen, einzelne von letzteren einen sehr chromatinarmen Kern enthalten und auffallend plasmaarm sind. Diese Mutterzellen werden, wie spätere Stadien zeigen, von den normalen allmählich verdrängt, sodass zuletzt nur noch kleine dunkelgefärbte Reste übrigbleiben. Am häufigsten tritt die Sterilität nach der Tetradenteilung hervor, und zwar wenn die Körner innerhalb der Muttermembran zu wachsen beginnen. Meine Beobachtungen decken sich hier also mit denen von GEERTS bei der Degeneration der Pollenkörner von *Oenothera Lamarckiana*.

In diesem Stadium des Verkümmerns sieht man, dass nicht alle die vier gebildeten Spezialzellen gleich gut entwickelt

sind, sondern eine oder zwei, ab und zu auch drei derselben einen unregelmässig begrenzten Kern mit sehr wenig oder fast gar keinem Chromatin besitzen. Da das Plasma dieser Körner dunkel gefärbt ist, tritt der Kern nur schwer hervor. Spätere Stadien zeigen den Kern der sterilen Körner im Plasma in Auflösung begriffen und im dunklen Plasma schwer wahrnehmbar. Bei vielen, nicht bei allen sterilen Körnern verschwindet zuletzt auch das Plasma, dass dann nur in der Nähe der Membran unregelmässige kleine Klumpen bildet.

Die fertilen Pollenkörner sind durch ihre Grösse von den sterilen direkt zu unterscheiden. Die Membran der sterilen Körner ist anscheinend normal gebaut, wird aber häufig eingedrückt, wahrscheinlich, weil die Körner fast ganz leer sind.

Eine eigentümliche Erscheinung an den sterilen Körnern enthaltenden Pollenfächern ist das gelegentliche Absterben von einzelnen Tapetenzellen. Der Kern, oder, wenn die Tapetenzelle mehrkernig ist, die Kerne, zerfallen, und im auffallend dunkel gefärbten Plasma findet man zuletzt nur noch unregelmässige Chromatinklumpen. Diese Erscheinung ist übrigens verhältnissmässig selten (Taf. XI, Fig. 66).

Zum Schlusse sei noch bemerkt, dass die hier beschriebenen cytologischen Bilder bei der Kali Mas-Hybride und deren vermutlichen Eltern (*C. arabica* und *C. liberica*) dieselben sind.

c. Das Nichtwachsen des Pollenschlauches durch den eigenen Griffel (Selbststerilität).

Dass der Pollenschlauch im Griffel der eigenen Blüte nicht zu wachsen, sondern nur eine kleine Strecke in das Griffelgewebe einzudringen vermag, sein Wachstum einstellt und dann platzt, habe ich sowohl bei Blüten von *C. arabica* als *C. liberica* und deren Hybride, der Kali Mas, gefunden.

Wie früher schon hervorgehoben, wächst der Pollenschlauch in dem Griffel der eigenen langsamer, als im Griffel einer anderen Blüte. Sind hier also wahrscheinlich bereits schädliche Einflüsse der autogamen Bestäubung im Spiele, so treten diese Einflüsse in den Fällen deutlich zu Tage, bei denen ein Wachstum

der Pollenschläuche im eigenen Griffel überhaupt nicht mehr stattfindet.

Während ich bei der Untersuchung der Griffel von Blüten von *C. arabica* und *C. liberica* die obenerwähnte Erscheinung seltener antraf, fand ich sie bei Sämlingen der Kali Mas-Hybride verhältnissmässig häufig.

Die Beobachtung lehrt, dass Blüten bestimmter Bäume dieser Sämlinge die Eigenschaft des Nichtwachsens der eigenen Pollenschläuche in besonderem Maasse besitzen. Ob auch die durch Propfen fortgepflanzte Hybride dieselbe Erscheinung zeigt, habe ich nicht weiter untersucht, halte es aber für wahrscheinlich ¹⁾.

Die anatomische Untersuchung der Griffel solcher Blüten zeigte keine besondere Abweichung vom gewöhnlichen Typus; die eingedrungenen Pollenschläuche sind alle an ihrer Spitze aufgetrieben und geplatzt.

Ich habe früher über die mutmaassliche Ursache des langsamen Wachstums der eigenen Pollenschläuche einiges mitgeteilt und sie mit den Verhältnissen im Leitgewebe in Verbindung gebracht. Die Ursache könnte auch, wie Jost dies getan hat, in den Pollenkörnern gesucht werden. Er sagt: „Anstatt die Ursache der Nichtwachsens der Pollenschläuche im Griffel der gleichen Blüte auf die Verhältnisse im Leitgewebe zu schieben, könnte man auch daran denken, sie in den Pollenkörnern zu suchen“.

Die Tatsache, dass bei der obenerwähnten Hybride und deren Eltern eine Degeneration des Pollens vorkommt, zwingt mich zu der Anschauung, die Ursache der Selbststerilität eher im Pollenkorn als im Leitgewebe zu suchen. Wenn wir annehmen, dass bei *C. arabica* und *C. liberica* bei autogamer Bestäubung auf den Reiz des Pollenschlauches hin das Leitgewebe wachstumshemmende Stoffe sezerniert, die zwar das Wachstum des Schlauches hemmen aber nicht verhindern können, so werden in den Fällen, wo das Pollenkorn in seiner Organisation mehr

1) Das Pfropfen ist hier auf Java die übliche Weise der künstlichen Vermehrung der Kali Mas-Hybride. Als Unterlage dient meist die *C. liberica*.

oder weniger gestört ist, diese wachstumshemmenden Stoffe nicht mehr vertragen und der Schlauch geht zu Grunde. Hier wirken die wachstumshemmenden Stoffe also wie Gifte. Bei Fremdbestäubung kann der Erfolg der Reaktion in der Sekretion wachstumsreizender Stoffe zu suchen sein.

ÜBER DAS VORKOMMEN VON KLEINEN CONSTANT-STERILEN BLÜTEN BEI VERSCHIEDENEN KAFFEE-ARTEN (SOG. „STERRETJES“).

Ausser den normal gebauten, grossen, duftenden Blüten besitzen hier auf Java einzelne Arten der Gattung *Coffea*, besonders *C. arabica* und *C. liberica*, noch ab und zu andere Blüten, die auf den ersten Blick durch ihren abweichenden Bau und ihre Kleinheit auffallen. Solche kleine sternähnliche, gelblich-weiße oder grünlichgelbe, nicht duftende Blüten werden auf Java allgemein mit dem holländischen Namen „sterretjes“ d. h. „Sternchen“ bezeichnet.

Das Vorkommen dieser kleinen, konstant sterilen Blüten dürfte wohl jedem javanischen Kaffeepflanzer bekannt sein; in der wissenschaftlichen Litteratur sind über die Morphologie und Entstehungsursachen dieser Blüten nur kurze Angaben vorhanden, die sich zum Teil nur auf Vermutungen stützen.

Am häufigsten zeigt diese Erscheinung *C. arabica*, seltener *C. liberica* und bis jetzt noch vereinzelt *C. Laurentii*, *C. uganda* und *C. quillou*, also die neueren Arten.

Zuerst haben BURCK ¹⁾ und ZIMMERMANN ²⁾ auf das Vorkommen der kleinen Blüten aufmerksam gemacht und in kurzen Zügen den äusseren Bau beschrieben. Von beiden wurde das Auftreten der kleinen sterilen Blüten mit einer zu grossen Boden- und Luftfeuchtigkeit in Verbindung gebracht, ohne sich auf experimentelle Beweise zu stützen.

1) Over koffieproducties in verband met den regenval. — Teysmannia, Bd. VII, 1895, S. 1.

2) Eenige pathologische en physiologische waarnemingen over koffie. — Mededeel. 's Lands Plantentuin, LXVII, 1904, S. 76.

Obwohl verschiedene Bäume von *C. arabica*, besonders in gewissen Teilen von Ost-Java, nur solche ausgebildete „Sterretjes“ tragen, fällt es doch nicht schwer, auch Bäume mit allen Übergängen von den normalen, grossen, duftenden Blüten bis zu den kleinen abnormal gebauten zu finden. Bei *C. liberica* beobachtete ich in meinem Versuchsgarten zu Buitenzorg häufig solche Übergänge, sodass ich reichlich Gelegenheit hatte, die Erscheinung eingehend zu studieren.

Bevor ich zur Beschreibung der kleinen Blüten übergehe, möchte ich bemerken, dass die sogenannten „Sterretjes“ im Gegensatz zu den normalen, grossen Blüten sehr lange am Baume sitzen bleiben und absolut steril sind. Ich habe zahlreiche „Sterretjes“ künstlich bestäubt und lange Zeit hintereinander beobachtet, ohne dass es mir gelang, eine Frucht zu erzielen. Diese Mühe hätte ich mir, wie ich später eingesehen habe, ersparen können, da die totale Sterilität bei der Untersuchung der Morphologie und besonders der Cytologie klar hervortrat und eine Bestäubung und Befruchtung der kleinen Blüten von vornherein ausgeschlossen erschien.

a. Morphologie der „Sterretjes“¹⁾.

Es sollen hier nur diejenigen kleinen Blüten, die am meisten von dem normalen Bau der gewöhnlichen Blüten abweichen, beschrieben werden, die unter dem Namen „echte Sterretjes“ bekannt sind. Die Übergangsformen, auch wohl „onechte Sterretjes“ genannt, können dann selbst leicht konstruiert werden.

Die „echten Sterretjes“ zeigen zunächst eine bedeutende Reduktion der Blütenkrone; der Kelch fehlt oder ist in den günstigsten Fällen nur noch mit einer Lupe wahrzunehmen, die Kronröhre ist sehr kurz oder, da die Kronblätter nicht miteinander verwachsen sind, gar nicht mehr vorhanden. Die Zahl der Kronblätter variiert zwischen 3 und 7, in den meisten Fällen findet man nur 3, 4 oder 5.

1) Gute Bilder von „Sterretjes“ hat ZIMMERMANN in seiner vorhin erwähnten Publikation gegeben.

Während die normalen Blüten dünne Kronblätter besitzen, sind sie bei den kleinen Blüten fleischig dick, schmal und mit den Rändern concav nach oben gebogen, wodurch sie eine Art Rinne bilden, in der meist eine oder zwei Antheren eingebettet liegen (Taf. XII, Fig. 68). Nicht selten sind sie Kronblätter dermaassen nach ihrer morphologischen Oberseite concav gekrümmt, dass sie die darin liegenden Antheren wie eine Röhre umschliessen.

Die nur an der Unterseite befindlichen Spaltöffnungen ragen etwas über die Oberfläche der Kronblätter hinaus. Die Cuticula hat sich stark verdickt; auch die Membranen der Mesophyllzellen sind dicker geworden als es normalerweise der Fall ist und lassen grosse, oft lacunenartig erweiterte Interzellularen zwischen sich (Taf. XII, Fig. 69). Eine Differenzierung in Palisaden- und Schwammparenchym ist in einigen Fällen andeutungsweise vorhanden.

Die Kronblätter sind äusserlich von einer deutlichen Harzschicht, ebenso wie bei den normalen Blütenknospen, überzogen.

Die grösste Abweichung vom normalen Bau zeigen die Antheren. Eine Differenzierung in Filament, Connectiv und Thecae ist nicht eingetreten; die ganze Anthere hat vielmehr etwas die Form der Kronblätter angenommen und ist bandförmig geworden.

Der Querschnitt zeigt eine viel unregelmässigere Begrenzung als bei den normalen Antheren und lässt die vorhandenen Thecae erst deutlich hervortreten.

Jede Theca zeigt in den meisten Fällen noch ein Pollenfach; in einigen Fällen war ein solches aber gar nicht mehr vorhanden. Die Epidermiszellen der Antheren sind unregelmässig nach aussen vorgewölbt und besitzen viel dickere Membranen und eine dickere Cuticula als es gewöhnlich der Fall ist.

Der weibliche Geschlechtsapparat, Fruchtknoten und Griffel zeigen äusserlich keine so eingreifenden Abweichungen vom normalen Bau, als der männliche Apparat. Es sind immer zwei Fächer im Fruchtknoten vorhanden. Der Griffel ist kurz und endet normal in zwei Narbenlappen, welche bei genauerer

Betrachtung Abweichungen zeigen. Die Narbenpapillen sind nicht von einander geschieden, wie dies sonst der Fall ist, sondern fest mit einander verbunden und haben dicke Membranen und eine dicken Cuticula; sie sondern niemals eine Flüssigkeit ab.

In den Fruchtknotenfächern finden wir stets zwei Samenknospen, die schon in ihrem Bau erheblich von den normalen abweichen. Während die normalen Samenknospen zur Zeit der Befruchtung eine ganz charakteristische Krümmung zeigen¹⁾, erscheinen die der kleinen Blüten niemals gekrümmt, sondern ragen als ein gerader Zapfen in das Fruchtknotenfach, ähneln also den Anfangsstadien der normalen Samenknospen.

Eine weitere morphologische Eigentümlichkeit der Samenknospe ist das gänzliche Fehlen der Integumente oder das Vorhandensein von nur zwei kleinen Ausstülpungen des Dermatogens der Samenknospe, wie sie auch in den Anfängen der Bildung der Integumente bei den normalen Samenknospen vorhanden sind. Eine Mikropyle fehlt hiernach gänzlich.

Das Leitgewebe ist sowohl im Fruchtknoten als im Griffel nicht ausgebildet.

Der Obturator fehlt gänzlich oder ist nur als kleiner Zapfen vorhanden. Die Entwicklung dieses für die Befruchtung so wichtigen Organs ist wie die der Integumente stehen geblieben. Aus allen diesen abweichenden morphologischen Verhältnissen und besonders aus der nachstehend beschriebenen cytologischen Untersuchung der Geschlechtsapparate geht schon mit ziemlicher Sicherheit hervor, dass eine Befruchtung des weiblichen Apparates unmöglich geworden ist.

b. Cytologie.

Das cytologische Studium der Geschlechtsapparate der kleinen Blüten zeigt einen Stillstand der Entwicklung auf primitiver Stufe und eine gänzliche Degeneration der Geschlechtszellen.

Betrachten wir zunächst den weiblichen Geschlechtsapparat, so finden wir, dass sich die normalerweise etwa 6 Zellschichten

1) Vergl. hierfür Beschreibung der Samenknospenentwicklung, S. 66.

unterhalb des Dermatogens. gelegene Archespozelle in einigen Fällen überhaupt nicht von den umgebenden Nucelluszellen differenziert. In den meisten Fällen ist eine Archespozelle noch deutlich sichtbar; sie ist aber immer schon degeneriert und die gefärbten Präparate zeigen ein zu Grunde gehen der Zelle. In solchen Präparaten ist das Plasma meist dunkel gefärbt und der grosse Kern auffallend chromatinarm (Taf. X, Fig. 61). Nur in zwei Fällen konnte ich die Teilung des Kernes beobachten, in der Archespozelle liegen dann zwei meist chromatinarme Kerne, wovon der eine viel kleiner ist als der andere (Taf. X, Fig. 60 und 62). Bei der Besprechung der Sterilität der normal aussehenden Blüten habe ich darauf hingewiesen, dass eine Degeneration des weiblichen Apparates in so frühen Stadien selten stattfindet und die Archespozelle noch vor Eintritt der Tetradenteilung zu Grunde geht.

Bei den „Sterretjes“ kommt niemals mehr eine Tetradenteilung vor.

Die Zellen des Nucellus weichen in ihrem cytologischen Bau ebenfalls vom normalen Typus ab, indem sie alle mehr oder weniger chromatin- und plasmaarm sind und manche von ihnen fast gar keine Kerne mehr zeigen.

Wie die Untersuchung lehrt, ist der männliche Geschlechtsapparat nicht auf einer so primitiven Stufe der Entwicklung stehen geblieben, bei der es fast immer noch zu einer Bildung von Mutterzellen des Pollens kommt, die aber deutlich degeneriert sind und niemals mehr Spezialzellen liefern. Das Plasma der Mutterzellen zeigt grosse Vakuolen; der Kern ist in klumpenartige Chromatinmassen zerfallen, die zerstreut im Plasma liegen (Taf. XI, Fig. 65, und Taf. XII, Fig. 70). In vielen Mutterzellen ist der Kern auffallend chromatinarm (Taf. XII, Fig. 71).

c. Sind die „Sterretjes“ gewöhnliche reduzierte Blüten?

In Pflanzerkreisen ist ab und zu noch die Ansicht verbreitet dass die „Sterretjes“ bestimmte Blüten der Kaffeepflanze sind, die mit den normalen nichts zu tun haben.

Die Entscheidung dieser Frage dürfte nicht schwer sein, wenn wir alle die morphologischen Eigentümlichkeiten der „Sterretjes“ mit denen der normalen Blüten vergleichen:

1. Es kommen, wie schon hervorgehoben, zwischen den normal aussehenden, grossen, duftenden Blüten alle Übergänge bis zu den kleinen als „Sterretjes“ bezeichneten vor.

Besonders klar tritt dies bei einzelnen Exemplaren von *C. liberica* zu Tage.

2. Der anatomische Bau der Kronblätter der kleinen Blüten stimmt genau überein mit dem normaler Blüten im Knospenzustande. Auch die die Kronblätter überziehende Harzschrift, besitzen die Knospen der normalen Blüten ebenfalls.

3. Die Antheren der „Sterretjes“ sind nicht in Filament, Connectiv und Thecae gesondert, wie dies auch normalerweise in den jungen Stadien der Blütenentwicklung der Fall ist.

4. Die Narbenlappen zeigen dieselben Eigentümlichkeiten wie die normaler Blüten in jungen Entwicklungsstadien; so z. B. sind die Papillen in jungen Stadien normaler Blüten noch fest mit einander verklebt. Das Leitgewebe ist in den jungen Entwicklungsstadien der normalen Knospen nicht oder erst unvollkommen entwickelt, wie das auch bei den „Sterretjes“ der Fall ist.

5. Die Samenknospen sind in den „Sterretjes“ einfache nicht gebogene, in das Fruchtfach ragende Zapfen genau wie in den Anfangsstadien der Entwicklung der normalen Knospen. Von Integument und Obturator gilt dasselbe.

6. Auch die cytologische Untersuchung der „Sterretjes“ lehrt, dass die Geschlechtsapparate genau so angelegt werden wie bei den normalen Blüten und nur auf sehr primitiver Stufe in ihrer Entwicklung stehen geblieben sind.

Nach alledem bin ich zu der Anschauung gekommen, dass die sogenannten „Sterretjes“ durch bestimmte Faktoren frühzeitig in ihrer Entwicklung gehemmte Blüten darstellen. Wie auch aus den experimentellen Versuchen hervorgeht, sind sowohl die gewöhnlichen sterilen, als auch die kleinen sterilen, die

sogenannten „Sterretjes“, keine verschiedenen Blüten, da sie beide auf dieselbe Art angelegt werden. Die schädlichen Faktoren haben den einen, gewöhnlichen sterilen Blüten noch eine Entfaltung erlaubt und nur die Sexualzellen zerrüttet, bei den anderen, den „Sterretjes“, aber dermaßen eingewirkt, dass eine normale Entwicklung nicht mehr möglich war.

DIE STERILITÄT IM ALLGEMEINEN.

Bevor wir zur Besprechung der Sterilität und deren Ursache beim Kaffeebaume übergehen, dürfte es nicht überflüssig sein, einen Augenblick beim Studium der Sterilität im Pflanzenreiche überhaupt zu verweilen.

Das Studium der Sterilität bei Pflanzen ist erst jungen Datums; bis jetzt sind erst wenig Pflanzen auf Sterilität hin geprüft worden und handeln die meisten derartigen Arbeiten über die Sterilität bei Bastarden.

Eingehende Arbeiten über die Sterilität bei Bastarden verdanken wir vor allem TISCHLER.¹⁾

Dieser Forscher untersuchte eingehend *Syringa chinensis* (*Syringa vulgaris* × *S. persica*) deren Pollen schon vorher JUEL²⁾ studiert hatte. Ausserdem untersuchte TISCHLER noch *Cytisus Adami*,³⁾ einen *Potentilla*-, *Bryonia*-⁴⁾ und *Mirabilis*-bastard, sowie weiter *Ribes*-bastarde.⁵⁾

Spärlichere Angaben sind über Sterilität bei reinen Arten vorhanden. DE VRIES berichtet, dass bei *Oenothera*-Mutanten ähnliche Störungen im Geschlechtsapparat vorkommen als bei den sterilen Hybriden, wodurch z. B. *Oenothera lata* völlig steril geworden ist. DE VRIES⁶⁾ gibt ferner an, dass Sterilität bei Äpfel- und Birnensorten, sterilen Korinthen und Bananen, sowie

1) Zellstudien an sterilen Bastardpflanzen. — Archiv für Zellforschung, Bd. 1, Heft 1, 1908.

2) Beiträge zur Tetradenteilung. — Pringsheims Jahrb. f. Wiss. Botan., Bd. 35, 1900.

3) Ber. d. Deutschen Botan. Ges. Bd. 21, S. 82—89, 1903.

4) Ebenda, Bd. 24, S. 83—96. 1906.

5) L. c.

6) Die Mutationstheorie. — Leipzig 1901—1903, Bd. 1, S. 137.

bei einigen Erdbeersorten und bestimmten Maisvarietäten durch Mutation entstanden ist. LORSY ¹⁾ macht auch schon auf die Ähnlichkeit mit den Hybriden aufmerksam und erwähnt die Ansicht KORSHINSKI, nach dem der Geschlechtsapparat der Mutanten gestört sei.

Wie sehr die Sterilität der Hybriden und die der Mutanten miteinander verbunden, d. h. einander ausserordentlich ähnlich ist, beweist schon der Umstand dass BATESON ²⁾, ihrer Sterilität wegen, *Oenothera Lamarckiana* als eine Hybride betrachtet, während GEERTS ³⁾ die Sterilität als eine Mutation auffasst; er betrachtet die Sterilität der Pollenkörner und die der Samenknochen als zwei voneinander unabhängige Mutationen.

Ausserdem gelang es, Sterilität an verschiedenen apogamen Pflanzen zu konstatieren, z. B. ROSENBERG ⁴⁾ an *Hieracium excelsa*. Das Studium der Cytologie von *Syringa chinensis* und einem *Potentilla*-Bastard hat das bedeutungsvolle Ergebniss gezeitigt, dass die Sterilität des Bastardes nicht ihren Grund in der Bastard-Natur hat, sondern einfach von einem oder von den beiden Eltern ererbt sein kann.

Für die Bastardsterilität hat besonders die Theorie der Chromosomen-Unverträglichkeit HAECKERS ⁵⁾ viel Anhänger geworben, die aber jeder experimentellen Untersuchung entbehrt; GATES ⁶⁾ sagt darüber: „Thus it appears that the cause must be sought in some more wide-spread phenomenon in the hybrid, causing general lack of nutrition of the parts which degenerate.“ Auch TISCHLER ⁷⁾ kommt bei seinen Untersuchungen zu dem Schlusse,

1) Vorlesungen über Descendenztheorien mit besonderer Berücksichtigung der botanischen Seite der Frage, gehalten an der Reichsuniversität zu Leiden. — Teil I, 1906.

2) Report to the evolution Committee. London, 1902, S. 153.

3) L. c., S. 103.

4) Ueber die Embryoentwicklung in der Gattung *Hieracium*. — Ber. d. D. Botan. Ges., Bd. 24, 1906.

5) Bastardierung und Geschlechtszellenbildung. Ein kritisches Referat. — Zool. Jahrbücher, Suppl. 7, S. 161—260, 1904.

6) Pollen-development in hybrids of *Oenothera lutea*, *O. Lamarckiana*, and its relations to mutation. — Bot. Gaz., Vol. 43, 1907.

7) Untersuchungen über die Entwicklung des Bananen-Pollens. I. — Archiv. für Zellforschung, Bd. 5, Heft 4, S. 622.

„dass die Sterilität der Hybriden keinen prinzipiellen Gegensatz zu einer solchen bei Nichthybriden zu bedeuten braucht, dass wenigstens, soweit morphologisch-cytologische Daten in Frage kommen, alle die von mir und anderen gesehenen Unregelmässigkeiten bei der Entwicklung der Sexualzellen auch durch andere Ursachen als das Nichtzusammenpassen der zwei in der Heterozygote vereinigten verschiedengeschlechtlichen Kernanteile hervorgerufen sein könnten“. Die Versuche TISCHLERS an einem *Potentilla*-bastard haben gezeigt, dass „schon bei demjenigen Elter, der für gewöhnlich nur gute Pollenkörner hervorbringt, durch den Kultureinfluss schwere Störungen eingetreten sind“ und dies „bei dem Bastard noch weit mehr der Fall ist“.

Hiermit sind wir bei dem grossen Gebiet der Sterilität bei Kulturpflanzen angelangt. DARWIN ¹⁾ gebührt das Verdienst zuerst auf die Sterilität bei Kulturpflanzen aufmerksam gemacht zu haben; er betrachtete die Kultur als einen Hauptfaktor der Sterilität. Die Kulturpflanzen sind solchen unnatürlichen Lebensbedingungen ausgesetzt, das es weiter nicht Wunder nimmt, wenn die Geschlechtsorgane darunter leiden.

GUIGNARD ²⁾ hebt hervor, dass unter den von ihm kultivierten reinen *Clematis*-Arten Sterilität auftrat, sodass er schwerlich im Stande war, die wirklichen Bastarde herauszufinden.

WILLE ³⁾ spricht ebenfalls über die veränderten äusseren Verhältnisse; er sagt: „Die Störungen in der inneren Organisation, welche durch die veränderten Verhältnisse, unter welche die Pflanzen durch die Kultur kommen, hervorgerufen werden, können also so durchgreifende sein, dass sie auf Teile einwirken, welche sonst bei der ganzen phylogenetischen Entwicklung sich am meisten unverändert erhalten haben“.

1) Das Variieren der Tiere und Pflanzen im Zustande der Domestikation (Uebersetzung von Carus) Bd. I u. II, Stuttgart, 1868.

2) Observation sur la stérilité comparée des organes réproducteurs des hybrides végétaux. — Bull. d. l. Soc. bot. de Lyon, 4 année., S. 66 - 78, 1887.

3) Ueber die Entwicklungsgeschichte der Pollenkörner der Angiospermen und das Wachstum der Membranen durch Intussusception. — Christiania Vid. Selsk. Forhand., N^o. 5, 1886. Nach Citat von TISCHLER.

Wichtig sind dann noch die Angaben von FAMILLER, wonach die verschiedenen Stufen des Verkümmerns der Geschlechtsorgane der Kulturpflanzen auch cytologisch nachgewiesen werden können.

Ohne Zweifel spielen die äusseren Verhältnisse bei der Bildung der Geschlechtszellen eine grosse Rolle.

Vorhin wurden die Versuche TISCHLERS in dieser Hinsicht erwähnt und kürzlich hat WULFF ¹⁾ die Sterilität der reinen Arten von Potentillen der verschiedenen Standorte als durch äussere Verhältnisse bedingte aufgefasst. Auch LIDFORSS ²⁾ hat vor einiger Zeit bereits gezeigt, wie empfindlich der Pollen gegen äussere ungünstige Verhältnisse ist und TISCHLER, der neuerdings die Pollensterilität der *Musa* genauer erforschte, kommt zu dem Schlusse, dass „denn wohl auch die Erscheinungen bei *Musa* unter die Rubrik der Beeinflussung durch äussere Agentien fallen“.

Wie fruchtbar erscheint das Studium der Sterilitätsursachen von diesem Gesichtspunkte aus betrachtet, gegenüber demjenigen, wo zu deren Erklärung theoretische Spekulationen herangezogen wurden, die zu beweisen unmöglich sind.

Es ist bis jetzt zu wenig versucht worden, die Sterilität als durch äussere Faktoren bedingt zu studieren und experimentell zu erzeugen; die schönen, uns durch KLEBS an die Hand gegebenen Methoden dürften bei dem experimentellen Studium der Sterilitätsursachen noch sehr viele wichtige Aufschlüsse liefern.

Bekanntlich hat dieser Forscher deutlich gezeigt, dass man es durch verschiedenen Kulturbedingungen häufig in der Macht hat, Blüten in ihrer Entwicklungsrichtung zu ändern. So ist es KLEBS ³⁾ gelungen, bei *Sempervivum* durch Verletzung und Verdunkelung, in Verbindung mit Temperaturänderung und

1) Ueber Pollensterilität bei *Potentilla*. — Oesterr. Bot. Zeitschr., Bd. LIX, S. 384—393, 415—424. 1909.

2) L. c.

3) Ueber Variationen der Blüten. — Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 42, S. 155—320, 1905.

CORRENS ¹⁾ bei *Satureja* Kontabesenz der Antheren zu erzielen.

An tropischen Kulturpflanzen sind Untersuchungen über Sterilität noch selten angestellt worden. Eine Mitteilung von WAKKER ²⁾ zeigt, wie bei Zuckerrohr durch Kultur Sterilität hervorgerufen wird; er fand bei den wilden und halbwilden Formen noch gar keine Abnormitäten, dagegen beim Cheribonrohr, sowie bei anderen in Kultur genommenen Rassen, starke Störungen in den Geschlechtszellen, die sogar so weit gehen, dass bestimmte Rassen überhaupt keine Blüten mehr produzieren.

DIE URSACHE DER STERILITÄT BEIM KAFFEEBAUME.

Fassen wir hier zunächst *C. arabica* ins Auge, bei der Sterilität eine häufige Erscheinung ist. Die Untersuchungen auf den Heterozygotismus dieser Pflanze hin zeigen auf das deutlichste, dass wir es hier nicht mit einem Bastard zu tun haben.

Nun bleibt noch die Frage offen, ob die partielle Sterilität vielleicht durch Mutation entstanden sein könnte. Tatsächlich sind Mutationen bei dieser Kaffeesorthe wahrgenommen worden; wenigstens können wir mit ziemlicher Sicherheit annehmen, dass die Maragogype-Varietät durch Mutation entstanden ist. Im Jahre 1870 wurde diese Pflanze in einer Kaffeepflanzung in Brasilien zwischen Sämlingen der typischen *C. arabica* wahrgenommen. Auch hier auf Java verdanken einige Varietäten wahrscheinlich Mutation ihre Entstehung (z. B. *C. arabica* var. *monosperma*, *C. arabica* var. *angustifolia* und var. *rotundifolia*). Da nun Mutationen bei *C. arabica* ab und zu beobachtet wurden, könnten wir die Sterilität als ihre Folge betrachten; der Umstand aber, dass die Sterilität eine so häufige Erscheinung ist und obendrein, wie die Beobachtung lehrt, in den verschiedenen Jahren und in bestimmten Gegenden an ein und demselben Baume sehr variieren kann, so erscheint es doch viel

1) Zur Kenntnis der Geschlechtsformen polygamer Blütenpflanzen und ihre Beeinflussbarkeit. — Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 44, S. 122—173, 1907.

2) Die generative Vermehrung des Zuckerrohrs. — Botan. Centralbl., Bd. 65, S. 37—42, 1896.

plausibler, die Sterilität als eine Folge von ungünstigen äusseren Bedingungen zu betrachten. In einer statistischen Abhandlung gibt Burck übersichtliche Tabellen über die Produktion des arabischen Kaffees auf Java, aus denen bereits mit Deutlichkeit hervorgeht, dass eine übermässige Feuchtigkeit während der Blüteperiode sehr ungünstig auf die Produktion einwirkt.

Von *C. liberica* sind ebenfalls Angaben über verminderte Produktivität infolge ungünstiger äusserer Faktoren vorhanden, die aber nicht so deutlich sind wie die für *C. arabica* gemachten, wahrscheinlich weil *C. liberica* weniger empfindlich ist. Trotzdem haben meine Versuche unzweideutig gelehrt, dass *C. liberica* ein ausgezeichnetes Objekt ist, um experimentell die schädlichen Einflüsse äusserer Faktoren auf den Geschlechtsapparat nachzuweisen.

Was die Sterilität der Kali Mas-Hybride anbelangt, so variiert diese ebenso wie die der Eltern, sowohl in den verschiedenen Jahren als auch in den verschiedenen Gegenden. Die Sterilität hier als eine Folge der Hybridennatur aufzufassen ist, nicht notwendig, da sie einfach ein Erbteil der beiden Eltern sein kann. Dass auch bei dieser Hybride die ungünstigen äusseren Faktoren störend auf die Geschlechtszellenbildung einwirken geht aus meinen Versuchen hervor.

Da wir durch Experimente die Pflanzen steril machen können, und zwar indem wir sie ungünstigen Wachstumsbedingungen aussetzen und dabei die Geschlechtszellen in ihrer Entwicklung hemmen, dürfen wir mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen, dass auch bei den kultivierten Kaffeesorten die partielle Sterilität durch äussere Einflüsse entstanden ist ¹⁾.

1) Bei anderen hier im Buitenzorger Botanischer Garten vorkommenden Rubiaceen (besonders *Pavetta*-Arten) habe ich ebenfalls Sterilität konstatieren können und zwar bei Arten die in ihrer Heimat gänzlich fertil sind. Einiges hierüber hoffe ich später publizieren zu können.

EXPERIMENTELLE VERSUCHE ÜBER DEN EINFLUSS DER
 ÄUSSEREN WACHSTUMSBEDINGUNGEN AUF DIE BILDUNG
 DER GESCHLECHTSORGANE BEI *C. LIBERICA*,
C. ARABICA UND DER KALI MAS-HYBRIDE.

Sämtliche in meinem Versuchsgarten ausgeführten Versuche mussten leider frühzeitiger abgebrochen werden als ich dies wünschte, so dass sie eigentlich kein abgeschlossenes Ganzes darstellen; vielleicht sind sie aber im Stande, Anderen einige Handhaben zu bieten, auf diesem Gebiete weiter zu arbeiten.

Da die Kaffeepflanze, wie schon einmal betont, erst nach einer Reihe von Jahren in das blütenreife Alter kommt und dann meist schon ein stattlicher Baum geworden ist, wird die Durchführung der Versuche sehr erschwert, ja manchmal gänzlich unmöglich gemacht. Dazu kommt noch der Umstand, dass die Kaffeepflanze eine sehr empfindliches Gewächs ist, so dass beim Verpflanzen in Töpfe, was für die Versuche häufig notwendig erschien, unliebsame Enttäuschungen erlebt wurden. Immerhin gelang es mir doch ziemlich, einen Einblick über den Einfluss verschiedener äusseren Bedingungen auf die Ausbildung der Blüten und besonders der Geschlechtsorgane zu erhalten.

a. Einfluss der Belichtung.

Anfang 1910 wurden drei zwei-jährige *Liberia*-pflanzen in fast völlige Dunkelheit gebracht, indem ich um die Bäume ein aus Geflecht hergestelltes Häuschen bauen liess, die zwecks Begiesung gelüftet werden konnten. Zur Kontrolle wurden gleichalterige Bäumen ausgewählt, die nur von oben gegen Regen geschützt und ebenso gegossen wurden wie die Verdunkelten. Die Pflanzen wiesen zur Zeit als sie unter Behandlung kamen, ganz winzige Blütenknospen auf, deren cytologische Untersuchung zeigte, dass im Nucellus eine Teilung des Archesporokernes noch nicht eingetreten war und sich in den Antheren überhaupt noch keine Archesporozellen differenziert hatten.

Nach 10 Tagen wurden einige inzwischen grösser gewordene Knospen fixiert und cytologisch untersucht. Eine Beeinflussung

durch die Verdunkelung war nicht zu bemerken. Aus dem weiblichen Archospor hatte sich normalerweise ein Embryosack gebildet, in dem gerade die Kernteilungen stattfanden. In den Antheren waren Pollenmutterzellen normalerweise vorhanden.

Der Versuch wurde noch weitere 10 Tagen durchgeführt, um eventuelle Unregelmässigkeiten in der weiteren Entwicklung der Sexualzellen zu konstatieren.

Nach Ablauf dieser 10 Tage öffneten sich die inzwischen stark vergrösserten Blütenknospen nicht mehr, sondern fielen geschlossen ab. Die cytologische Untersuchung der Sexualapparate ergab, dass im weiblichen Apparat ein normal aussehender Embryosack vorhanden war, während sich im männlichen Teil der Blüte zwar noch Spezialmutterzellen des Pollens gebildet hatten, die Pollenbildung aber nicht mehr zu Stande gekommen war.

Eine Kontrolle der normal belichteten Pflanzen zeigte schon verschiedene geöffnete Blüten mit normal ausgebildeten Geschlechtsapparaten.

Ich hatte eigentlich erwartet, dass sich die Knospen der verdunkelten Pflanzen im dem stark herabgeminderten Lichte noch öffnen würden, da dies bei verdunkelten Pflanzen, die vor dem Verdunkeln schon Blütenknospen gebildet hatten, häufig der Fall ist. Die Kaffeeblüten sind aber für schwaches Licht sehr empfindlich, da sie sich, wie ich häufig beobachten konnte, sogar im Zimmer, wo doch verhältnismässig viel Licht eintreten kann, bereits nicht mehr öffnen. Nun ist allerdings die *Liberia*-Kaffeeblüte darin bedeutend empfindlicher, als z. B. die *Robusta*-Blüte.

Derselbe Versuch wurde auch mit *C. arabica* und der Kali Mas-Hybride mit dem gleichen Resultat ausgeführt.

Nach dem Versuch erfolgte wieder eine normale Belichtung der behandelten Pflanzen, da sie sonst bald zu Grunde gehen würden. Die Versuchspflanzen verloren bald nach dem Versuche zahlreiche Blätter, die aber bald wieder ersetzt wurden.

Ende April erfolgte bei 5 von den 9 Versuchspflanzen (2 *C. liberica*, 1 *C. arabica* und zwei Exemplare der Kali Mas-Hybride) wieder ein neuer Ansatz von Blütenknospen und konnte der Versuch wiederholt werden. Nach 10-tägiger Verdunkelung waren

die Knospen kleiner als im ersten Versuch, die cytologische Untersuchung zeigte aber jetzt bereits merkbare Störungen in der Ausbildung der Geschlechtszellen. Die Blütenknospen waren vielfach frühzeitig in geschlossenem Zustande abgefallen; ihre cytologische Untersuchung ergab, dass in den meisten Fällen noch eine Tetradenteilung stattgefunden hatte, die Zellen aber anfangen zu schrumpfen; das Plasma hatte sich von der Membran abgezogen und färbte bei der Tinction auffallend dunkel, die Kerne sahen anscheinend normal aus. In solchen Präparaten waren die 4 Zellen schon mit schwacher Vergrößerung als dunkler Streifen sichtbar.

Bei vielen Blütenknospen der Kali Mas-Hybride konnte noch eine normale Embryosackentwicklung konstatiert werden. Deshalb hier die Entwicklung nicht so frühzeitig gehemmt worden war als bei den beiden reinen Arten, vermag ich nicht zu sagen. In den Antheren der Knospen der Versuchspflanzen fanden sich zahlreiche unregelmässig begrenzte, sich dunkel färbende Pollenkörner, die sich bei Aussaatversuchen als steril erwiesen. Auch bei den Blütenknospen der Kali Mas-Hybride war eine Degeneration der Pollenkörner eingetreten.

Die Kontrollpflanzen wiesen auch diesmal ganz normal sich öffnende Blüten auf.

Von den 5 Versuchspflanzen gingen mir dann infolge Krankheiten 3 ein (in zwei Fällen war die Ursache des Absterbens *Corticium javanicum* und im einen Falle unbekannt), sodass die Versuche nur noch mit einem Exemplar von *C. liberica* und einem von der Kali Mas-Hybride fortgesetzt werden konnten.

Die dritte Wiederholung des Versuches geschah Anfangs Juli. Die Pflanzen wurden in der oben beschriebenen Weise verdunkelt und begossen. Das Resultat dieses Versuches war wieder ein frühzeitiges Abfallen der jungen Blütenknospen, das aber weniger stattgefunden hatte als in den beiden vorigen Versuchen, ein Vorgang, den ich nicht mehr weiter verfolgen konnte. Die cytologische Untersuchung erbrachte den interessanten Nachweis, dass die Entwicklung der Geschlechtszellen schon wieder früher sistiert war als im vorigen Versuch. Im weiblichen Geschlechts-

apparat erwies sich die Archesporzelle meist schon degeneriert, das Plasma hatte sich stark kontrahiert und tingierte sich dunkel, der Kern war unregelmässig begrenzt und im dunklen Plasma schwer aufzufinden.

Die Fortsetzung der Versuche mit denselben Bäumen war jetzt nicht mehr möglich, da sie ihre Blätter verloren und fast ganz kahl standen.

Jedenfalls war aus diesen Versuchen der schädliche Einfluss des stark herabgeminderten Lichtes auf die Ausbildung der Blüte im Allgemeinen und der Geschlechtszellen im Besonderen hervorgegangen und zwar hat sich gezeigt, dass wiederholte Einwirkung auf die jedesmal neu gebildeten Blütenknospen eine immer stärkere schädliche Wirkung ausübt, was auch cytologisch in den weiblichen und männlichen Sexualapparaten genau zu verfolgen ist.

Interessant ist es, wie beim Kaffeebaum und zwar besonders bei *C. liberica* die Blütenknospen auf die Verdunkelung fast alle in gleichem Masse reagieren; man findet selten eine Blüte sich weiter entwickeln als eine andere.

Aus den oben beschriebenen Versuchen darf natürlich nicht gefolgert werden, die Verdunkelung wirke allein direkt auf die Ausbildung der Blüten und ihre Geschlechtszellen ein. Die sich hierbei abspielenden Prozesse sind jedenfalls nicht so einfacher Natur. Es sei hier nur daran erinnert, dass durch die Verdunkelung die photosynthetische Nahrungsbereitung gehemmt und hierdurch eine völlige Entwicklung der Blüten unmöglich gemacht wird. Es würde aus dem Rahmen der Arbeit fallen, diese Probleme hier weiter zu erörtern, ich verweise hierfür auf die Arbeiten von SACHS ¹⁾, VÖCHTING ²⁾, GOEBEL ³⁾, KLEBS ⁴⁾, LOEW ⁵⁾, FISCHER ⁶⁾ u. A.

1) Stoff und Form der Pflanzenorgane. — I Arb. d. Botan. Instituts in Würzburg 2 B., 1892 und Gesammelte Abhandlungen 2 Bd.

Ueber die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die Blütenbildung. — Arb. d. Botan. Instituts in Würzburg, 1887.

2) Ueber den Einfluss des Lichtes auf die Gestaltung und Anlage der Blüten. — Pringsheims Jahrb. f. wiss. Botan., 25 Bd., 1893.

Für die Fussnoten 3, 4, 5, 6 siehe Seite 149.

Die Frage, wie die Verdunkelung einwirkt, ist in praktischer Hinsicht von geringerer Bedeutung; die Hauptsache ist, zu beweisen, dass schlechte Lichtverhältnisse die Sterilität hervorrufen können.

Es dürfte nun der Einwand erhoben werden, eine Verminderung des Lichtes, so wie ich sie auf die Bäume habe einwirken lassen, kommt in der Natur niemals vor, da in einer beschatteten Pflanzung immerhin bedeutend mehr Licht zu den Bäumen gelangen kann. Es kam mir aber gar nicht darauf an, zu entscheiden, bei welcher Intensität des Lichtes noch eine völlige Entwicklung und bei welcher eine solche nicht mehr möglich ist, übrigens eine Frage von grosser Bedeutung, sondern darum, zu entscheiden, ob überhaupt das Licht hier einen grossen Einfluss ausübt.

Um die Frage zu beantworten, bei welcher Lichtintensität noch eine normale Entwicklung stattfindet, müsste man genaue photometrische Methoden ¹⁾ anwenden, wozu uns WIESNER ²⁾ wertvolle Beiträge geliefert hat.

Die Tatsache, dass sich häufig Blüten von *C. liberica* im Zimmer, wo doch noch verhältnismässig viel Licht eintreten kann, nicht mehr öffnen, beweist schon ihre grosse Empfindlichkeit; natürlich spielen auch hierbei individuelle Schwankungen eine grosse Rolle.

Noch ein anderer Umstand verdient hier Berücksichtigung. Auf Java wird die Kaffeepflanze, besonders *C. arabica*, auf grossen Höhen kultiviert, wo die Temperatur niedriger als in

3) Organographie der Pflanzen. — Jena 1898–1901.

Die kleistogamen Blüten und die Anpassungstheorien. — Biolog. Centralbl., 24 Bd., 1904, S. 673:

4) Einige Ergebnisse der Fortpflanzungsphysiologie. — Ber. d. D. Botan. Ges., 18 Bd., 1900, S. (201).

5) Zur Theorie der blütenbildenden Stoffe. — Flora, Bd. 94, 1905, S. 124.

6) Ueber die Blütenbildung in ihrer Abhängigkeit vom Licht und über die blütenbildenden Substanzen. — Ebenda, S. 478.

1) BUNSEN und ROSCOE. — Photometrische Untersuchungen. VI. Abhandlg. Meteorologische Lichtmessungen. — Poggendorffs Annalen, Bd. 117, 1862.

2) Photometrische Untersuchungen auf pflanzenphysiologischem Gebiete. — Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wiss. Math. Naturw. Kl., 90, 1893–1905.

anderen, tiefer gelegenen kaffeeproduzierenden Gegenden ist. Das Lichtbedürfnis dieser in grösseren Höhen wachsenden Pflanzen wird ein grösseres sein als das der in niedrigeren Gegenden vorkommenden, da, nach den Gesetzen WIESNERS, das Lichtbedürfnis der Pflanzen mit abnehmender Temperatur wächst. So dürften vielleicht Bäume, die unten mit dem Lichte auskommen, in den höheren Gegenden unter denselben Lichtverhältnissen nicht mehr gedeihen. Es ist mir z. B. aufgefallen, dass in Ost-Java in verhältnissmässig grosser Höhe *C. arabica* wenig Blüten trägt und dann häufig nur noch die sogenannten „Sterretjes“; vielleicht ist diese Kalamität zum Teil dem Mangel an Licht zuzuschreiben.

b. Einfluss der Bodenfeuchtigkeit,

Wie erwähnt, wurde von BURCK schon statistisch nachgewiesen, dass die Produktion des Kaffeebaumes in feuchten Jahren durchschnittlich kleiner ist als in den trockneren. Die Frage nach dem Einfluss der Feuchtigkeit, hier Bodenfeuchtigkeit, auf die Ausbildung der Blüten und Geschlechtszellen musste daher einmal experimentell geprüft werden.

Zu diesem Zwecke operierte ich wieder mit *C. liberica* und mit der Kali Mas-Hybride.

Zur Verwendung kamen kräftige, gesunde, 3-jährige, blühreife Bäume. Um die Feuchtigkeit des Bodens genau regeln und bequem kontrollieren zu können, wurden die Versuchsbäume in grosse Töpfe gebracht.

Nachdem die Pflanzen ganz winzige Blütenknospen zu bilden anfangen, was natürlich nicht bei allen Exemplaren gleichzeitig der Fall war, kamen die Töpfe bis etwa 10 cm unter dem oberen Rande in mit Wasser gefüllte Bottiche zu stehen; das Wasser wurde, jenachdem es aufgenommen oder verdampft war, wieder ersetzt. Die Bäume standen auf diese Weise zur Zeit der Blütenbildung in sehr feuchtem Boden.

Der Verlauf der Knospenbildung war bei den Versuchspflanzen äusserlich zunächst normal und nicht nennenswert von dem der Kontrollpflanzen verschieden. Nur glaubte ich festgestellt

zu haben, dass sich die Blüten der Versuchsbäume etwas früher öffneten als die der Kontrollpflanzen, doch zeigten hierin die verschiedenen Bäume kleinere Unterschiede. Einige Knospen fielen frühzeitig ab, aber die meisten öffneten sich normalerweise. Die cytologische Untersuchung der Geschlechtsapparate ergab nichts abnormales.

Nach Beendigung dieses Versuches kamen die Töpfe wieder aus dem Wasser, da sonst Fäulniss der Wurzeln zu befürchten war.

Der Versuch konnte noch einmal wiederholt werden, nachdem die Bäume wieder kleine Blütenknospen zu bilden anfangen. Dieser zweite Versuch zeigte nun deutlicher als der erste, dass sich die Knospen der Versuchsbäume viel früher öffneten als die der Kontrollpflanzen. Diese Tatsache kam mir nicht so überraschend vor, da ich früher schon die Erfahrung machte, dass Regen bei dem Öffnen der Kaffeeblüte eine grosse Rolle spielt, eine Erscheinung, die auch bei anderen Pflanzen vorkommen dürfte. So sieht man in einer Pflanzung nicht selten, wie sich ganz entwickelte Knospen erst öffnen, nachdem ein starker Regen niedergegangen ist.

Die genaue Betrachtung der geöffneten Blüten der Versuchspflanzen und besonders der Vergleich mit denjenigen der Kontrollbäume ergab, dass sich die Blüten der Versuchspflanzen im Verhältniss zu ihrer morphologischen Entwicklung entschieden zu früh geöffnet hatten.

Die cytologische Untersuchung zeigte den weiblichen Apparat normal entwickelt, während sich die Pollenkörner noch nicht von einander gelöst hatten, was sonst bei geöffneten Blüten wohl der Fall ist. Eine autogame Bestäubung hatte niemals stattgefunden. Bei der Kali Mas-Hybride waren obendrein viele taube Pollenkörner vorhanden, die am Anfang des Versuchs, wie die Kontrolle zeigte, nicht gefunden wurden.

Die Versuche konnten nicht mehr wiederholt werden, und ich musste mich mit den oben beschriebenen Resultaten begnügen. Diese waren zwar nicht dermaassen, dass ein völliger Einblick in den Einfluss der Bodenfeuchtigkeit auf die Ausbildung der Blüten gewonnen wurde, dafür müssten solche

Versuche in grösserem Umfange und längere Zeit hindurch angestellt werden. Die Versuche zeigen allein, dass die grosse Feuchtigkeit des Bodens die Entwicklung der Blüte beschleunigt, insofern aber störend einwirkt, als sich die Blütenknospen früher öffnen als mit der Ausbildung ihrer Organe vereinbar ist.

Eingehendere Versuche auch mit Berücksichtigung der Luftfeuchtigkeit wären auch hier sehr erwünscht.

c. Einfluss von wenig Licht und übermässiger Bodenfeuchtigkeit auf die Ausbildung der Blüten und deren Geschlechtszellen.

Die durch die oben beschriebenen Versuche gewonnenen Erfahrungen liessen es wünschenswert erscheinen, die Kombination der beiden äusseren Einflüsse einmal experimentell zu prüfen. Hierzu wurden 2 *C. liberica*-, 2 *C. arabica*- und 2 Kali Mas-Hybriden-bäume verwendet. Die Pflanzen kamen, wie oben beschrieben, in stark herabgemindertem Licht und in sehr feuchten Boden, sobald sie winzige Anlagen von Blütenknospen zeigten. Die Kontrollpflanzen wurden teilweise nur verdunkelt, teils nur in sehr feuchte Erde gebracht und teils in normalen Verhältnissen belassen.

Die Resultate dieser Versuche zeigten zunächst, dass die allein verdunkelten Kontrollbäume normale Knospen lieferten, die sich aber nicht öffneten, sondern geschlossen abfielen. Die cytologische Untersuchung ergab das Vorhandensein eines normal entwickelten Embryosacks. Der männliche Teil der Blüte war ebenfalls normalerweise entwickelt, nur war die Lostrennung der Pollenkörner unterblieben. Die nur in feuchter Erde gehaltenen Bäume hatten ihre Blüten, von denen sich auch viele öffneten, normal entwickelt. Die Ausbildung der Geschlechtsapparate war normal.

Die Bäume endlich, die einer Kombination der schädlichen Einflüsse ausgesetzt waren, hatten ebenfalls ihre Blüten äusserlich normal entwickelt, wovon sich bereits viele geöffnet hatten und dadurch von den nur verdunkelten sofort zu unterscheiden waren. Die cytologische Untersuchung einiger Blüten ergab

nichts Abnormales, nur war das frühzeitige Öffnen der Blüte im Verhältnis zu der Ausbildung der Geschlechtszellen auffallend. Hier trat scheinbar der Einfluss zu grosser Bodenfeuchtigkeit wie im zweiten Versuch, deutlich zu Tage.

Es galt nun die Versuche zu wiederholen und zwar mit denselben Bäumen, da, wie früher schon bewiesen, der schädliche Einfluss besonders der Verdunkelung erst allmählich hervortritt.

Der Versuch konnte nur noch mit einem Liberiabaum und einem Arabicabaum fortgesetzt werden, da die anderen Bäume zu sehr gelitten hatten und ihre Blätter verloren.

Der zweite Versuch wurde Juli wiederholt, als die Versuchsbäume neue Blütenknospen zu bilden angingen. Von den Kontrollpflanzen konnte zur selben Zeit nur 1 Liberiabaum benutzt werden, da dieser sich ebenfalls zur selben Zeit zur Knospenbildung anschickte, während die anderen Kontrollpflanzen wegen Mangel an Blättern für einen nochmaligen Versuch nicht in Frage kamen. Ich benutzte diesen einen Liberiabaum dazu, allein den Einfluss der wiederholten Verdunkelung zu kontrollieren.

Das Resultat des zweiten Versuches war ein interessanteres. Der eine Kontroll-liberiabaum hatte kleine Blütenknospen gebildet, die bereits nach 8 Tagen abzufallen begannen. Eine Degeneration der Geschlechtszellen war deutlich cytologisch nachzuweisen. In vielen Pollenmutterzellen hatte sich das Plasma stark kontrahiert und dunkel gefärbt. Der Kern war unregelmässig begrenzt und chromatinarm. Im Embryosack wurde eine Eizelle nicht mehr gebildet; die Degeneration war etwa im 8-Kernstadium eingetreten. Das Plasma der Embryosackzelle färbte sich krankhaft stark.

Die beiden, einer Kombination der schädlichen Einflüsse ausgesetzten Bäume bildeten kleine Blütenknospen, wovon sich bereits einige geöffnet hatten oder im Begriffe waren, sich zu öffnen. Eigenartig war die noch halb grüne Farbe der Kronblätter. Eine Ähnlichkeit dieser geschädigten Blüten mit den „Sterretjes“ war nicht zu verkennen. Leider mussten die Versuche abgebrochen werden.

Natürlich ist es mir in der kurzen Zeit nicht gelungen, echte

„Sterretjes“ hervorzubringen, dazu müssten die Versuche viel länger fortgesetzt werden und verschiedene andere Faktoren, so z. B. der Einfluss grosser Luftfeuchtigkeit, mageren Bodens etc. auf die Entwicklung der Blüten geprüft werden.

Ich glaube aber, dass wir mit den oben beschriebenen Versuchen auf dem richtigen Wege sind, die Frage der Sterilität und der Entwicklung der „Sterretjes“ experimentell zu lösen; die im letzten Versuch erzielten kleinen Blüten halte ich für Anfänge von „Sterretjes“-bildung. Vielleicht müssen die schädlichen Faktoren erst Generationen oder jedenfalls Jahre hindurch auf die Pflanzen einwirken, um genau dieselben „Sterretjes“ hervorzubringen, wie wir sie in Ost-Java so häufig zu beobachten die Gelegenheit finden. Es ist ferner die Möglichkeit vorhanden, dass die „Sterretjes“-bildung auch durch andere Ursachen als schwaches Licht und übermässige Bodenfeuchtigkeit erzeugt wird, so z. B. durch Nahrungsmangel bei magerem Boden oder Nahrungsmangel infolge von Krankheiten. In alten Pflanzungen von Ost-Java produziert *C. arabica* auffallend wenig Blüten und dann meist nur sogenannte „Sterretjes“, was nicht zu verwundern ist, wenn man bedenkt, dass die Pflanzen seit Jahrzehnten aus dem gleichen Boden ihre Nahrung holen, ohne dass der Boden durch Düngung wieder fruchtbar gemacht wird.

Die Untersuchung dieser Fragen eröffnet Anderen noch ein weites und interessantes Feld der Betätigung.

INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite.
EINLEITUNG	59
ENTWICKELUNGSGESCHICHTE, MORPHOLOGIE UND CYTOLOGIE DER KAFFEEBLÜTE.	60
Methode	60
1. Ontogenetische Entwicklung der Blüte	62
2. Das Gynaeceum	63
a. Anatomie des Fruchtknotens und der Frucht mit Ausnahme der Samen- anlagen	63
b. Die Samenanlagen.	64
c. Der Obturator	68
3. Cytologische Untersuchung des Gynaeceums.	71
a. Das Archespor	71
b. Bildung des Embryosacks	73
c. Präsynapsis, Synapsis, Reduktionsteilung und Tetradenteilung	73
4. Das Androeceum	83
a. Entwicklung der Antheren	83
b. Urmutterzelle und Mutterzelle	83
c. Synapsis und Tetradenteilung.	84
d. Der Pollen	86
e. Tapete	87
DIE BEFRUCHTUNG.	88
a. Das leitende Gewebe.	88
b. Das Wachstum des Pollenschlauches durch den Griffel nach der Eizelle und die Befruchtung.	91
VORGÄNGE NACH DER BEFRUCHTUNG.	96
a. Das Schwinden des Obturators	96
b. Endospermibildung.	97
c. Endospermispalte	99
d. Der Embryo.	100
e. Die Samenschale	101
UNREGELMÄSSIGKEITEN BEI DER ENTWICKELUNG	102
a. Bildung von runden Samen (Perlkaffee)	102
b. Sogenannte „Polyembryonie“.	102
EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ÜBER BESTÄUBUNG UND BEFRUCHTUNG BEI KAFFEE- ARTEN.	105
PHYSIOLOGISCHE VERSUCHE AN POLLENKÖRNERN.	117
a. Ueber die Keimung der Pollenkörner und das Wachstum der Keim- schläuche in künstlicher Nährlösung	118
b. Ueber den Einfluss von äusseren Faktoren auf die Lebensdauer des Pollens	122
c. Einfluss des Alters auf die Keimfähigkeit	127
UEBER PARTIELLE STERILITÄT BEIM KAFFEE	127
a. Degeneration des weiblichen Sexualapparates	128

b. Degeneration des männlichen Sexualapparates	130
c. Das Nichtwachsen der Pollenschläuche durch den eigenen Griffel (Selbststerilität).	131
UEBER DAS VORKOMMEN VON KLEINEN CONSTANT STERILEN BLÜTEN BEI VERSCHIEDENEN KAFFEE-ARTEN	133
a. Morphologie der „Sterretjes“	134
b. Cytologie.	136
c. Sind die „Sterretjes“ gewöhnliche sterile Blüten?.	137
DIE STERILITÄT IM ALLGEMEINEN.	139
DIE URSACHE DER STERILITÄT BEIM KAFFEEBAUME.	143
EXPERIMENTELLE VERSUCHE ÜBER DEN EINFLUSS DER ÄUSSEREN FAKTOREN AUF DIE BILDUNG DER GESCHLECHTSORGANE BEI C. LIBERICA, C. ARABICA UND DER KALI MAS-HYBRIDE.	145
a. Einfluss des Lichtes	145
b. Einfluss der Bodenfeuchtigkeit	150
c. Einfluss von wenig Licht und übermässiger Bodenfeuchtigkeit auf die Ausbildung der Blüten und deren Geschlechtszellen	152
Figurenerklärungen	157

FIGURENERKLÄRUNGEN.

Sämtliche Figuren wurden mit Hilfe eines Zeichenprisma's nach ABBE gezeichnet.

TAFEL I.

- Fig. 1.** Spitze des Vegetationspunktes von *C. liberica* mit Anlage der vier Hüllblätter. Vergr. etwa 60 mal.
- Fig. 2.** Etwas älteres Stadium; die Anlage der eigentlichen Blüte ist als eine flache Warze sichtbar. Vergr. etwa 60 mal.
- Fig. 3.** Noch älteres Stadium; Anlage der Kelchzipfel als Warzen sichtbar. Vergr. etwa 60 mal.
- Fig. 4-7.** Längsschnitte verschiedener Stadien der Blütenentwicklung, etwas schematisiert. Vergr. etwa 70 mal.
- Fig. 8.** Eine Blütenknospe von *C. liberica* von oben gesehen, mit Anlagen der Kelch-, Kronblätter, Antheren, und Fruchtblätter. Vergr. etwa 50 mal.

TAFEL II.

- Fig. 9.** Junges Stadium der Samenknochenentwicklung. Vergr. 190 mal.
- Fig. 10.** Etwas älteres Stadium als in Figur 9; Integument und Obturator werden angelegt. Vergr. 130 mal.
- Fig. 11.** Gleichfalls, etwas älteres Stadium. Vergr. 130 mal.
- Fig. 12.** Ausgewachsene Samenknope, das Integument hat sich geschlossen, der Obturator seine grösste Ausdehnung erreicht. Vergr. etwa 130 mal.

TAFEL III.

- Fig. 13.** Archespor von *C. liberica*, aus drei Zellen bestehend. Vergr. 530 mal.
- Fig. 14.** Entwicklung der mittleren Archesporzelle. Die Chromosomen in der Kernplatte. Vergr. etwa 700 mal.
- Fig. 15.** Homöotypische Teilung in der Mutterzelle. Die Spindeln sind parallel zur Längsachse der Zelle gerichtet, eine Anzahl extranukleolarer Nukleolen im Plasma sichtbar. Die beiden seitlichen Archesporzellen verkümmern. Vergr. 940 mal.
- Fig. 16.** Ausgebildete Tetrade in einer Samenknope von *C. arabica*; eine Wandbildung zwischen den Kernen findet nicht statt. Vergr. 940 mal.

TAFEL IV.

- Fig. 17.** Längsschnitt durch den unteren Teil einer älteren Samenknospe, nicht median getroffen. Verwachsungsstelle des Obturators mit der Samenknospe deutlich sichtbar. Vergr. 74 mal.
- Fig. 18.** Gleichfalls, aber Medianschnitt; Mikropyle und Obturatorschuppe sichtbar. Vergr. 190 mal.
- Fig. 19.** Tetrade einer Samenknospe von *C. liberica*; die drei unteren nackten Zellen werden von der oberen verdrängt. Vergr. 940 mal.
- Fig. 20.** Junger Embryosack von *C. Laurentii*; die vier Spindeln der Tochterkerne an den Polen. Vergr. 530 mal.
- Fig. 21.** Oberer Teil des Embryosacks; die beiden senkrecht aufeinander stehenden Spindeln; im Plasma sind die extranukleolaren Nukleolen zu sehen. Vergr. 1340 mal.

TAFEL V.

- Fig. 22.** Zweikerniger Embryosack von *C. liberica*. Vergr. 530 mal.
- Fig. 23.** Erwachsener Embryosack derselben Pflanze. Vergr. 530 mal.
- Fig. 24.** Oberer Teil des Embryosacks kurz vor der Befruchtung; die beiden generativen Kerne sind sichtbar, einer davon kurz vor der Verschmelzung mit den Eikern. Der Pollenschlauch ist zwischen Synergide und Embryosackwand wahrnehmbar. Vergr. 1340 mal.
- Fig. 25.** Antipoden eines Embryosacks von *C. liberica*; unterhalb der Antipoden reihenweisen Anordnung der Zellen bemerkbar. Vergr. 1340 mal.
- Fig. 26.** Zwei Polkerne kurz vor ihrer Verschmelzung miteinander; der obere Polkern verschmilzt mit dem zweiten, generativen Kern. Vergr. 1500 mal.
- Fig. 28.** Befruchteter Polkern aus dem Embryosack von *C. liberica*. Vergr. 1500 mal.

TAFEL VI.

- Fig. 29.** Vegetativer Kern aus dem Integumentgewebe von *C. liberica*, die Prochromosomen zeigend. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 30.** Präsynaptisches Stadium des Archesporkerns; die Chromatinsammlungen gehen in das Fadengerüst über. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 31.** Beginn der Synapsis; die Prochromosomen sind zu parallel verlaufenden Fäden angeordnet. (Aus der Archesporzelle von *C. arabica*) Vergr. 3000 mal.
- Fig. 32.** Synapsis; Chromatinfäden gebildet. (Aus der Archesporzelle von *C. liberica*) Vergr. 3000 mal.
- Fig. 33.** Höhepunkt der Synapsis. (Aus der Archesporzelle von *C. liberica*). Vergr. 3000 mal.
- Fig. 34.** Gelockertes Pachynema. (Aus der Archesporzelle von *C. liberica*) Vergr. 3000 mal.
- Fig. 35.** Diakinese (Aus der Archesporzelle von *C. arabica*). Vergr. 3000 mal.
- Fig. 36.** Spirem eines Tochterkernes des Embryosacks von *C. liberica*. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 37.** Pollenmutterzelle von *C. liberica*; Chromosomen in der Kernplatte. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 38.** Homöotypische Kernspindeln aus der Tetradenzelle von *C. liberica*. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 39.** Heterotypische Kernspindeln; die Tochterchromosomen gehen auseinander. (Aus der Archesporzelle von *C. arabica*). Vergr. 3000 mal.
- Fig. 40.** Heterotypische Kernspindel; Beginn des Auseinanderweichens der Chromosomen. (Aus der Archesporzelle von *C. liberica*). Vergr. 3000 mal.
- Fig. 41.** Interkinetischer Kern aus dem Archesporium von *C. liberica*. Vergr. 3000 mal.

TAFEL VII.

- Fig. 42.** Querschnitt eines Loculus einer Anthere von *C. liberica*; Pollenmutter- und Tapetenzellen. Vergr. 1500 mal.
- Fig. 43.** Segmentierung des Fadens in einer Pollenmutterzelle von *C. liberica*. Vergr. 2000 mal.
- Fig. 44.** Kernspindel einer Pollenmutterzelle von *C. liberica*; die Chromosomen gehen nach den Pollen, eine Längsspaltung derselben ist gut wahrnehmbar. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 45.** Synapsis. Pollenmutterzelle von *C. liberica*. Vergr. 2000 mal.
- Fig. 46.** Diakinese. Pollenmutterzelle von *C. liberica*. Vergr. 2000 mal.

TAFEL VIII.

- Fig. 47.** Zwei senkrecht aufeinanderstehende Spindeln in der Pollenmutterzelle von *C. liberica*. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 48.** Zwei normal gebaute Pollenkörner von *C. liberica* vor dem Ausstäuben. Vergr. 1500 mal.
- Fig. 49.** Normale Pollenkörner mit vegetativem und generativem Kern. Vergr. 1500 mal.
- Fig. 50.** Generative Kerne am Pollenschlauchende. Vergr. 1500 mal.
- Fig. 51.** Zweikernige Tapetenzelle von *C. arabica*. Vergr. etwa 1000 mal.
- Fig. 52.** Längsschnitt eines Loculus einer Anthere von *C. arabica*; Beginn der Degeneration der Mutterzellen. In einer Mutterzelle ist der Kern bereits zerfallen, im anderen chromatinarm. Vergr. 940 mal.

TAFEL IX.

- Fig. 53.** Narbenpapillen. Vergr. 345 mal.
- Fig. 54.** Eindringen der Pollenschläuche zwischen die Narbenpapillen. Vergr. 170 mal.
- Fig. 55.** Pollenkörner von *C. arabica*. Vergr. 345 mal.
- Fig. 56.** Flächenschnitt durch eine Anzahl von Narbenpapillen, die Interzellulare zwischen denselben zeigend. Vergr. 345 mal.
- Fig. 57.** Längsschnitt durch das Leitgewebe des Griffels unterhalb der Narbenlappen. Vergr. 580 mal.
- Fig. 58.** Keimende Pollenkörner. Vergr. 345 mal.

TAFEL X.

- Fig. 59.** Degeneration des weiblichen Sexualapparates nach der Tetradenteilung. Vergr. 940 mal.
- Fig. 60.** Degenerierende Archesporzelle einer „Sterretjes“-Blüte; zwei ungleich grosse, chromatinarme Kerne. In den umgebenden Nucelluszellen ist bereits eine Degeneration einzelner Kerne zu bemerken. Vergr. 1000 mal.
- Fig. 61.** Degenerierende Archesporzelle von *C. arabica*. Vergr. 1000 mal.
- Fig. 62.** Degenerierende Archesporzelle einer „Sterretjes“-Blüte. Vergr. 1000 mal.
- Fig. 63.** Kern einer Archesporzelle von *C. liberica*, degenerierend; das Chromatin hat sich in unregelmässige Klumpen zusammengeballt. Vergr. 3000 mal.
- Fig. 64.** Gleichfalls. Vergr. 3000 mal.

TAFEL XI.

- Fig. 65.** Querschnitt durch einen Loculus einer „Sterretjes“-Blüte; Pollenmutterzellen und Tapetum degenerierend. Vergr. 1500 mal.

Fig. 66 und 67. Querschnitte durch
Loculi von Antheren der *C. arabica*
Blüte; Zugrundegehen von Pollen-

mutterzellen; in Fig. 66 ist das Ab-
sterben der Tapetenzellen zu bemer-
ken. Vergr. 1500 mal.

TAFEL XII.

Fig. 68. Querschnitt durch zwei Kron-
blätter und Antheren einer „Ster-
retjes“-Blüte. Vergr. 74 mal.

Fig. 69. Querschnitt durch eine Spalt-
öffnung und das Mesophyll einer „Ster-
retjes“-Blüte. Vergr. 345 mal.


Fig. 70. Unregelmässige Chromatinklum-

pen in einer degenerierenden Pollen-
mutterzelle von einer „Sterretjes“-
Blüte. Vergr. 3000 mal.

Fig. 71. Chromatinarmer Kern in einer
Pollenmutterzelle einer „Sterretjes“-
Blüte. Vergr. 3000 mal.

TABLE DES MATIÈRES.

BERNARD (Ch.) et H. L. WELTER, A propos des ferments oxydants	1
A. Discussion des méthodes utilisées pour mettre en évidence les ferments oxydants.	1
B. Essais concernant plus spécialement les ferments oxydants du thé.	20
FABER (Dr. F. C. von), Morphologisch-Physiologische untersuchungen an Blüten von Coffea-arten	59
Figurenerklärungen zu Tafel I—XII.	157



ANNALES
DU
JARDIN BOTANIQUE
DE
BUITENZORG.

DIRIGÉES PAR

J. C. KONINGSBERGER
Directeur du Jardin

ET

CH. BERNARD
Docteur ès Sciences.

(Volume XXV).

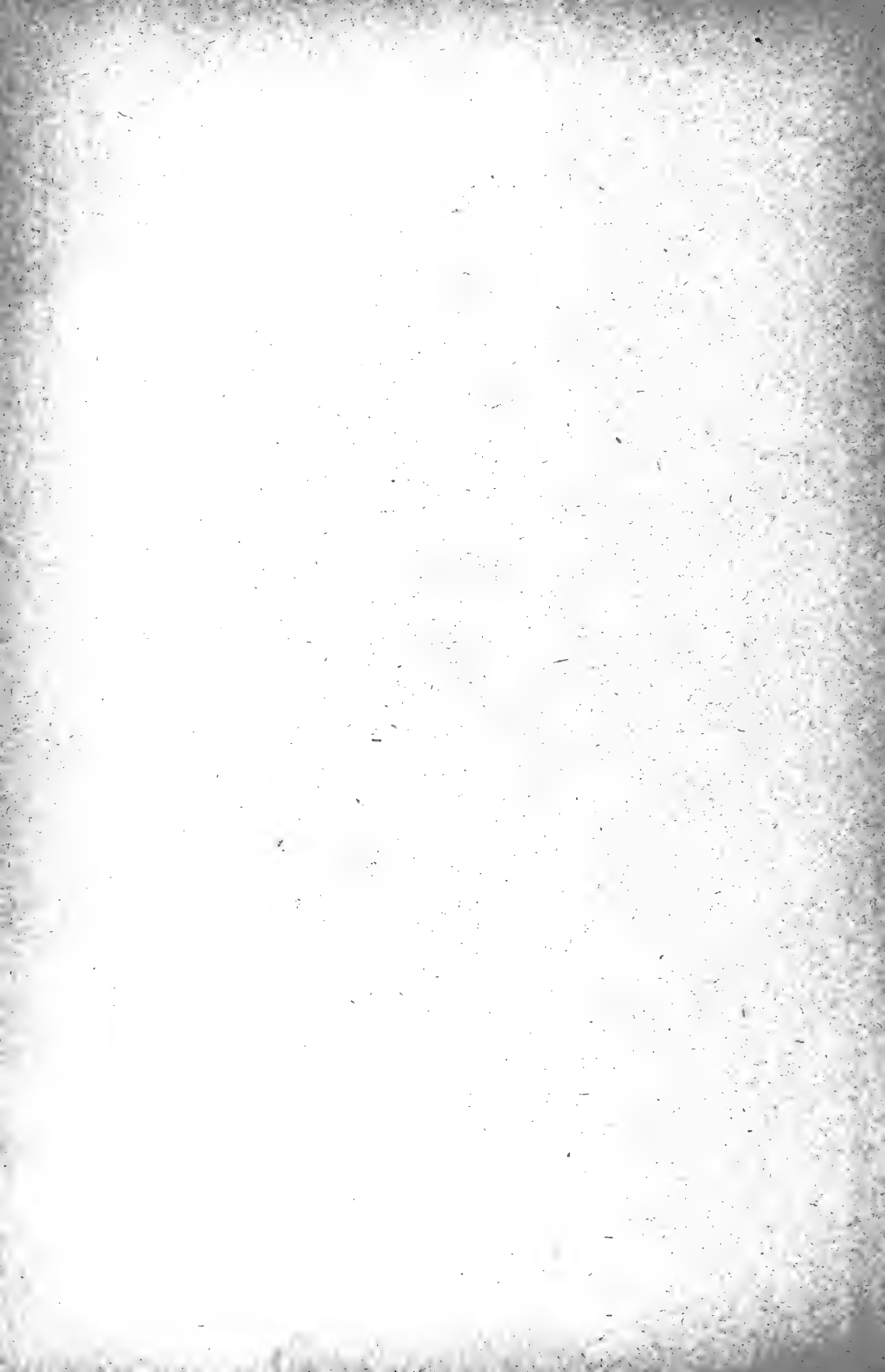
DEUXIÈME SÉRIE.

VOLUME X.

2^{me} PARTIE.

LIBRAIRIE ET IMPRIMERIE

CI-DEVANT
E. J. BRILL
LEIDE — 1912



BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER SAPROPHYTEN JAVAS.

VON

A. ERNST UND CH. BERNARD.

IX. Entwicklungsgeschichte des Embryosackes und des Embryos von *Burmannia candida* Engl. und *B. Championii* Thw.

VON

A. ERNST UND CH. BERNARD.

(Hierzu Tafel XIII—XVII).

Über den Entwicklungsgang der Samen, speziell des Embryosackes, des Embryos und Endosperms der *Burmannia*-arten sind wir durch die schon mehrfach zitierten Arbeiten von TREUB¹⁾ und JOHOW²⁾ wenigstens in grossen Zügen orientiert. Von den beiden in der Überschrift genannten *Burmannia*-arten ist die eine, *B. candida* (in TREUBS Arbeit als *Gonyanthes candida* bezeichnet), von TREUB ebenfalls untersucht worden. Verschiedene wichtige Entwicklungsstadien, deren Feststellung und Diskussion erst in neuerer Zeit grosse Wichtigkeit beigemessen worden ist, sind in den Arbeiten TREUBS und JOHOWS teils noch gänzlich unberücksichtigt geblieben oder nur kurz gestreift

1) TREUB, M., Notes sur l'embryon, le sac embryonnaire et l'ovule. 3. *Gonyanthes candida*, *Burmannia javanica*. Ann. d. Jardin botan. d. Buitenzorg. Bd. III, 1883, S. 120—122. 4 Tafel.

2) JOHOW, F., Die chlorophyllfreien Humusbewohner West-Indiens. Jahrb. f. wiss. Botanik. Bd. XVI, 1885, S. 415—449. 3 Tafeln.

— — —, Die chlorophyllfreien Humuspflanzen nach ihren biologischen und anatomisch-entwicklungsgeschichtlichen Verhältnissen. Jahrb. f. wiss. Botanik. Bd. XX, 1889, S. 475—525. 4 Tafeln.

worden: die Vorgänge der Tetradenteilung und Chromosomenreduktion, diejenigen der Bestäubung und Befruchtung. Eine nochmalige, ausführliche Darstellung der Embryologie saprophytischer *Burmannia*-arten ist also, sofern sie ihr Hauptgewicht auf die Feststellung der genannten, noch wenig bekannten Vorgänge legt, ohne weiteres gerechtfertigt. Eine solche Untersuchung allein liefert auch die notwendigen Vergleichspunkte für die ausführliche Darlegung der interessanten Vorgänge im Entwicklungsgang von *B. coelestis*, über welche von uns bereits in einer vorläufigen Mitteilung ¹⁾ berichtet worden ist.

Für die beiden in der Überschrift genannten *Burmannia*-arten sind alle wichtigeren Phasen der Entwicklung im Laufe unserer Untersuchung aufgefunden worden, doch ist selbverständlich, dass beim eingehenden Detailstudium für die einen Entwicklungsstadien die Präparationen von *B. candida*, für andere dagegen diejenigen von *B. Championii* günstiger waren und bevorzugt wurden.

Um die zahlreichen Wiederholungen einer für beide Arten getrennten Beschreibung zu vermeiden, soll im nachfolgenden eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse unserer Untersuchungen an beiden Arten gegeben werden. In den der Arbeit beigelegten Tafeln ist in erster Linie der Entwicklungsgang von *Burmannia candida* zur Darstellung gelangt. Für *B. Championii* haben wir uns auf eine eingehende Darstellung der Tetradenteilung und der Befruchtungsvorgänge beschränkt und nur wenige weitere Zeichnungen beigegeben, welche die Übereinstimmung des ganzen Entwicklungsganges mit demjenigen von *B. candida* nachweisen sollen.

1. Erste Entwicklung der Samenanlage, Ausbildung der Embryosackmutterzelle und Tetradenteilung.

Die ersten Teilungsvorgänge, welche die Entwicklung der Samenanlagen einleiten, stimmen bei *B. candida* und *B. Cham-*

1) ERNST, A., Apogamie bei *Burmannia coelestis* Don. Ber. d. d. bot. Ges. Jahrg. 1909, Bd. 27. S. 157—168. 1 Tafel.

pionii völlig überein. An der Oberfläche der in der Fruchtknotenachse verlaufenden Plazentarwülste wölben sich einzelne Epidermiszellen papillenartig vor und teilen sich durch eine Querwand in basale und scheitelständige Zelle. Die erstere wird nachher rasch durch mehrere Teilungen in eine mehr oder weniger tetraedrisch geformte Innenzelle und einige Aussenzellen zerlegt. Die Innenzelle unterscheidet sich in der Beschaffenheit ihres Inhaltes in keiner Weise weder von den übrigen Zellen des kleinen Gewebehöckers noch von denjenigen des Plazentagewebes. Aus ihr geht durch weitere Teilungen eine kurze Reihe von 4—5 Zellen hervor (Fig. 1, Taf. XIII).

Von den zunächst völlig gleich grossen und gleich geformten Zellen dieser Reihe vergrössert sich später die oberste. Ihr Plasma wird dichter und ist stärker färbbar als dasjenige der übrigen Zellen. Ebenso wird der Kern dieser Zelle grösser als derjenige der benachbarten Zellen. (Fig. 5 und 6, Taf. XIII). In Fruchtknoten von *B. Championii* mit solchen Entwicklungsstadien der Samenanlagen ist der Raum zwischen Plazenten und Fruchtknotenwand noch so schmal, dass viele der kleinen Ovularhöcker mit ihrem Scheitel an der Fruchtknotenwand anstossen und deren innerste Zellschichten zusammenpressen.

In Samenanlagen dieses Alters sind stets Kerne und Zellen in Teilung begriffen. Die Präparate sind reich an Kernteilungsfiguren, doch ist der genaue Verlauf der Teilungsvorgänge in den verhältnismässig kleinen und dicht mit Inhalt erfüllten Zellen nur mühsam festzustellen. Die Chromosomen sind meistens dermassen zusammengedrängt, dass es schwer hält, auch nur ihre Zahl genau zu bestimmen. Indessen glauben wir doch angeben zu können, dass sowohl in den peripherischen Zellen der jungen Anlagen, wie in den Zellen der mittleren Reihe (Fig. 2—4, Taf. XIII) die Chromosomenzahl 12 beträgt. Die gleiche Zahl fanden wir auch bei Untersuchung der Kernteilungen in jungen Pollensäcken vor Ausbildung der Pollenmutterzellen. Viel leichter ist die Feststellung der Chromosomenzahl bei der ersten Teilung der Embryosack- und Pollenmutterzellen, wo sie durch Reduktion auf die Hälfte, also 6,

vermindert wird (Fig. 7—12, Taf. XIII). *B. candida* und *B. Championii* stimmen also in der Chromosomenzahl wahrscheinlich mit *Thismia javanica* überein, für welche K. MEYER¹⁾ (l. c. S. 9) bei Teilungen in den Pollenmutterzellen resp. der Teilung des progamen Pollenkornkerns 6—8 Chromosomen zählte. Ein wichtiger Unterschied zwischen *Thismia javanica* und unseren *Burmanni*arten besteht aber darin, dass bei ersterer während der Teilungen der Embryosackmutterzelle eine Chromosomenreduktion ausbleibt, während sie bei *B. Championii* und *B. candida* in der Makrosporen- und in der Mikrosporenmutterzelle stattfindet.

Der sichere Nachweis einer heterotypischen Kernteilung mit Chromosomenreduktion in der obersten Zelle der subepidermalen Reihe junger Samenanlagen deutet darauf hin, dass diese Zelle, die Archesporzelle, ohne vorherige Bildung von Tapetenzellen zur einen Embryosackmutterzelle der Samenanlage geworden ist.

Der weitere Verlauf der Tetradenteilung ist bei den beiden *Burmanni*arten nicht völlig übereinstimmend. Bei *B. candida* teilt sich die Embryosackmutterzelle durch eine Querwand, deren Lage aus derjenigen der Zellplatte in Figur 13 Taf. XIII ersichtlich ist, in zwei Tochterzellen. Diese sind in den einen Samenanlagen völlig gleich gross, in anderen aber übertrifft die untere Zelle an Grösse die obere schon von Anfang an (Fig. 14, Taf. XIII). Die obere Tochterzelle erfährt weder weiteres Wachstum, noch eine Kern- und Zellteilung. Die untere dagegen nimmt an Grösse rasch zu, ihr Plasma ist dicht und ihr Kern grösser als derjenige der benachbarten Nuzelluszellen. Sie wird, ebenfalls ohne weitere Teilungen, zur Embryosackzelle. Während ihres weiteren, raschen Wachstums drückt sie die obere Schwesterzelle zusammen (Fig. 15, 16, Taf. XIII), so dass diese vielfach schon vor der ersten Teilung des Embryosackkerns völlig verschwunden oder später nur noch in Form einer schmalen, dunkel gefärbten Kappe am Scheitel des Embryosackes sichtbar ist.

1) MEYER, K., Untersuchungen über *Thismia clandestina*. Bulletin de la Société Imp. d. Naturalistes de Moscou, 1909. S. 1—18, 2 Tafeln.

Während bei *B. candida* also die Tetradenteilung auf die Bildung von zwei Schwesterzellen reduziert ist, zeigt *B. Championii* noch einen vollständigeren Verlauf der Tetradenteilung. In einem Teil ihrer Samenanlagen werden vier, in andern drei Tetradenzellen erzeugt. Unsere Präparate enthalten hiefür eine grosse Anzahl Belege und auf Tafel XVI sind eine Anzahl verschiedener Stadien aus dem Verlauf der Tetradenteilung von *B. Championii* dargestellt.

Die Embryosackmutterzelle von *B. Championii* erreicht vor der ersten Teilung ihres Kernes im Vergleich zur Gesamtgrösse der Samenanlage ungewöhnliche Dimensionen. Sie ist mit Ausnahme ihrer Basis ringsum nur von einer epidermalen Zellschicht umschlossen. Ihr Plasma ist bis gegen die Oberfläche des Kernes ziemlich gleichmässig dicht, hier etwas dichter und stärker färbbar. In dem grossen Kern ist ausser einem Kernkörperchen in den präsynaptischen Stadien ein körnerreiches Fadennetz sichtbar (Fig. 1, Taf. XVI). In besonders grosser Zahl sind in den Präparaten die Stadien der Präsynapsis und der Synapsis vorhanden. Auf diesen Stadien ist der Kern völlig kugelig oder in einer Richtung etwas verlängert. Sein Durchmesser beträgt bei kugeliger Gestalt meistens 18μ , bei ellipsoidischer in einer Richtung maximal 20μ , bei einer Länge der Mutterzelle von 37μ und einer Breite derselben in der kernhaltigen Zone von 22μ . Reichlich sind ferner Metaphasen und Anaphasen der heterotypischen Teilung gefunden worden. Die Gemini sind kurze, dicke Stäbchenpaare, die sich vollständig in die Aequatorialebene einstellen, so dass sie in ihrer Gesamtheit in der Seitenansicht der Teilungsfigur einen ziemlich gleichmässig breiten Chromatingürtel bilden (Fig. 2, Taf. XVI). Von auffällender Schönheit sind in diesen Teilungen die achromatischen Spindeln. Sie setzen sich aus einer grossen Zahl ziemlich derber und stark färbbarer Fasern zusammen, die im Stadium der Metakinese eine fast tonnenförmige Figur bilden. Leider ist es nicht gelungen, von diesen Stadien auch einzelne in Polansicht zu erhalten. In der Seitenansicht ist die Anzahl der Chromosomen schwierig zu bestimmen. Doch war

es in einigen Fällen möglich, sicher deren sechs zu zählen. Nach Verlauf der Chromosomenwanderung (Fig. 3 und 4, Taf. XVI) bleiben die Fasern in der aequatorialen Zone noch längere Zeit erhalten und bilden eine breiter werdende und sich bis zur Zellwand ausdehnende Tonnenfigur, in welcher median die Zellplatte (Fig. 5, Taf. XVI) und nachher eine Teilungswand auftritt. Die beiden Tochterzellen sind entweder völlig gleich gross (Fig. 5, Taf. XVI), oder es wird die untere von Anfang an etwas grösser angelegt (Fig. 6, Taf. XVI). Die zweite, homöotypische Teilung der Kerne folgt der ersten Teilung bald nach. Es geht dies aus der Tatsache hervor, dass man in einem Fruchtknoten oft alle Stadien von der Vorbereitung zur Synapsis bis zur fertigen Tetrade vorfindet und weiter daraus, dass in Samenanlagen mit homöotypischen Teilungen und fertigen Tetraden weder der Nucellus noch die Integumente merklich gewachsen erscheinen. In sämtlichen Fällen, in welchen eine gleichzeitige Kernteilung in beiden Tochterzellen zur Beobachtung gelangte, stehen die Achsen der beiden Teilungsfiguren in der Art ungefähr senkrecht zu einander, dass die Spindelfigur der unteren Zelle in der Längsrichtung, diejenige der oberen in der Diagonal- oder Querrichtung der Zelle ausgespannt ist. Die zweite Teilung unterscheidet sich von der ersten nicht nur durch die geringere Grösse der chromatischen Elemente, sondern auch durch das Aussehen der ganzen Teilungsfigur, deren achromatischer Teil in beiden Zellen eine spitz endigende Spindel bildet, welche mit ihren Enden, zum mindesten in der oberen Zelle (Fig. 7, Taf. XVI), bis an die Wandschicht des Plasmas reicht. Der zweiten Kernteilung folgt die zweite Zellteilung nach, durch welche eine Tetrade von Einzelzellen erzeugt wird. Entsprechend der Orientierung beider Spindeln und der aus ihnen hervorgehenden Einzelkerne, liegen die beiden oberen Einzelzellen nebeneinander (Fig. 8 und 9, Taf. XVI), die aus der unteren Tochterzelle entstehenden dagegen übereinander. Von den vier Zellen werden zunächst die beiden oberen und später auch die nächstfolgende durch die unterste Tetradenzelle verdrängt.

Diese selbst wird zur Embryosackzelle (Fig. 8, Taf. XVI). Einige weitere der auf Tafel XVI enthaltenen Bilder (Fig. 10—14) zeigen noch, dass in einzelnen Samenanlagen mit unvollständiger Tetradenteilung wenigstens die untere der durch die erste Teilung entstandenen Tochterzellen noch die zweite Kern- und Zellteilung erfährt. Nach der ersten Teilung der Mutterzelle nimmt in diesen Fällen die untere Tochterzelle unter Vorwölbung der Teilungswand in den Raum der oberen Zelle an Grösse zu (Fig. 10 und 11, Taf. XVI). In ihr allein erfolgt die homöotypische Kernteilung und die nachfolgende Zellteilung, so dass also statt einer vollständigen Tetrade von 4 Enkelzellen eine Reihe aus drei übereinander liegenden Zellen, der oberen Tochterzelle und den beiden aus der unteren Tochterzelle entstandenen Enkelzellen, gebildet wird. In zahlreichen weiteren Samenanlagen von *B. Championi* endlich wird, wie schon bemerkt worden ist, die Tetradenteilung gleich wie bei *B. candida* schon nach der ersten Teilung sistiert. Die homöotypische Teilung findet nur noch in der unteren Tochterzelle statt und liefert die beiden ersten Kerne des Embryosackes.

Es ergeben also schon die wenigen bis jetzt auf den Verlauf der Tetradenteilung untersuchten Burmanniaceen ausgehend von vollständiger Tetradenteilung eine lückenlose Reihe von Reduktionsstadien bis zu völliger Unterdrückung derselben. Bei *Thismia javanica* findet nach unserer Feststellung (III. 1909 S. 54) eine vollständige Tetradenteilung, allerdings ohne Reduktion der Chromosomenzahl statt. Ferner gibt JOHOW für die westindische *Gymnosiphon trinitatis* (l. c. 1885 S. 439) normale Tetradenteilung und Bildung des Embryosackes aus der „untersten Tochterzelle zweiten Grades“ an. Studien über Chromosomenreduktion sind von ihm nicht gemacht worden. Aus seinen weiteren Ausführungen und seinen Zeichnungen ist aber zu schliessen, dass bei jener Pflanze Befruchtung sehr wahrscheinlich ist. Es dürfte daher auch die der Embryosackentwicklung vorausgehende vollständige Tetradenteilung mit einer Chromosomenreduktion verbunden sein. Bei *B. Championii* finden wir neben Samenanlagen mit vier und drei Tetradenzellen

zahlreiche weitere mit nur zwei solchen Zellen, von denen die untere zum Embryosack auswächst. Bei *B. candida* ist diese Form der Tetradenteilung zur Regel geworden und bei *B. coelestis* schliesslich bleibt die Tetradenteilung in der Mehrzahl der Samenanlagen vollständig aus. Die Embryosackmutterzelle wird direkt zum Embryosack, wobei die weitere Entwicklung ohne Chromosomenreduktion vor sich geht.

2. Ausbildung des achtkernigen Embryosackes.

Bei *B. candida*, ebenso bei *B. Championii*, ist während des ganzen Verlaufes der Tetradenteilung die sporogene Zelle nur von der einzigen Schicht epidermaler Nucelluszellen umgeben. Grösse und Form des die Mutterzelle und ihre Teilungsprodukte bergenden Teils der Samenanlage verändern sich fast nicht. Dagegen findet während der beschriebenen Teilungen durch starkes Wachstum und intensive Zellteilungen in den basalen Partien der Samenanlage die Anlage der Integumente und unter starker Ausprägung der anatroischen Krümmung die Scheidung eines Stiels vom Körper der Samenanlage statt (Fig. 5—6 und 13—16, Taf. XIII). Die Teilungen zur Bildung des zuerst auftretenden inneren Integumentes erfolgen am Umfang des Nucellus, etwa auf dem Niveau der Basis seiner Embryosackmutterzelle. Der Scheitel des bald sichtbaren Ringwulstes mit seinen im Schnitt dreieckig erscheinenden Zellen verharret während des ganzen Verlaufes der Tetradenteilung (Tafel XVI) ungefähr in mittlerer Höhe der Mutterzelle oder der aus ihr entstehenden Reihe von Tochter- und Enkelzellen. Auf der dem Funiculus abgekehrten Seite kommt ferner bald das rasch heranwachsende äussere Integument zur Entwicklung. Gleichzeitig mit den beiden Integumenten verlängert sich der Nucellus durch Streckung und Teilung seiner unter dem Embryosack liegenden, peripheren und zentralen Zellen nach unten. Die Zahl der den Embryosack direkt umgebenden Zellen dagegen bleibt, wie aus den Längsschnitten durch Samenanlagen (Taf. XIII, XVI, XVII), hervorgeht, noch lange Zeit ziemlich gleich.

Die Entwicklung der einkernigen Embryosackzelle zum achtkernigen Embryosacke mit Eiapparat, Antipoden und freien Polkernen findet in der gewohnten Weise statt. Nach der ersten Teilung ihres Kernes nehmen die Tochterkerne an den Schmalseiten der inzwischen in der Richtung der Achse gewachsenen Zelle Aufstellung. Durch den zweiten Teilungsschritt entstehen hier die Zweiergruppen, durch den dritten die bekannten Vierergruppen von Kernen (Fig. 16, 17, Taf. XIII, Fig. 1, Taf. XIV und Fig. 1—5, Taf. XVII). Während dieser Kernteilungsvorgänge erfolgt die Vakuolenbildung im Cytoplasma und schliesslich die Entstehung des zentralen, die beiden Kerngruppen scheidenden Saftraumes. Während bei *B. candida* diese Vorgänge nur von einem geringen Wachstum des Embryosackes begleitet sind und die Vakuolenbildung häufig unregelmässig und verspätet sich abspielt, geht bei *B. Championii* schon der ersten Teilung des Embryosackes ein starkes Wachstum voraus. Der ersten Kernteilung folgt dann sofort die Entstehung von kleineren Einzelvakuolen und hernach die Bildung des grossen zentralen Saftraumes nach. Der zweite und dritte Teilungsschritt folgen dann, ohne dass während derselben eine weitere Grössenzunahme des Sackes zu konstatieren wäre, so rasch auf einander, dass der achtkernige Embryosack nicht oder doch nicht wesentlich grösser ist als der zweikernige Embryosack (Fig. 4 und 5, Taf. XVII).

Im achtkernigen Embryosacke haben, besonders deutlich bei *B. Championii*, die acht Kerne schon bald nach ihrer Entstehung verschiedenes Aussehen. Den Figuren 4 und 5, Tafel XVII z. B. ist zu entnehmen, dass die Anordnung der acht aus der letzten Teilung hervorgehenden Kerne in vier Paaren zunächst einige Zeit erhalten bleibt. In der scheidelständigen Vierergruppe sind bald die beiden Kerne des die Synergidenkerne liefernden Paares, bald diejenigen des dem Saftraum des Embryosackes genäherten Paares, welches Eikern und Polkern liefert, etwas grösser. In den vier oberen Kernen bilden sich die Kernkörperchen früher als in denjenigen der unteren Gruppe. Für diese ist ferner charakteristisch, dass in den beiden Kernen des

untersten Paares, welche stets zu Antipodenkernen werden, Kernkörperchen auch in späteren Stadien nicht enthalten sind.

Durch die Zellbildung wird im achtkernigen Embryosacke vor allem ein gut differenzierter, grosser Eiapparat gebildet, während die Antipodenzellgruppe bedeutend kleiner bleibt. Die beiden einander aufsuchenden Polkerne treffen sich nicht in genau fixierter Stellung, sondern bald in der Nähe der Antipoden (Fig. 6, Taf. XVII), bald in der Mitte des Embryosackes (Fig. 4, Taf. XIV, Fig. 7, Taf. XVII), nicht selten auch in unmittelbarer Nähe der Eizelle.

Nach erfolgter Zellbildung sind die Zellen des Eiapparates zunächst noch klein und die gegenseitige Abgrenzung häufig so fein, dass die trennenden Plasmahäute auch an gut gefärbten Präparaten nicht wahrgenommen werden können (Fig. 6, Taf. XVII). Später sind Eizelle und Synergiden von *B. Championii* langgestreckt und die erstere hängt mit ihrem Scheitel häufig bis in die Mitte des Embryosackraumes hinunter. Die Lage der Kerne in den drei Zellen, sowie die Verteilung des Zytoplasmas und der Safräume ist, wie aus den Figuren 6—8, Tafel XVII hervorgeht, die allgemein übliche. Unmittelbar vor der Befruchtung ist der Eikern gewöhnlich oval und ziemlich grösser als die Synergidenkerne, welche einen einseitig leicht eingebuchteten Rand besitzen. Bei *B. candida* (Fig. 2—5, Taf. XIV) zeigen sich ähnliche Grössen- und Formunterschiede zwischen den drei Zellen des Eiapparates.

Am Antipodenende geht die Zellbildung bei beiden Arten gewöhnlich etwas langsamer vor sich als am Eiende, indessen werden auch hier meistens deutliche Zellen abgegrenzt. Im besondern kommt stets eine scharfe Scheidung der Antipodengruppe nach oben gegen das Plasma des Embryosackraumes hin zu Stande, während im Inneren der Gruppe die gegenseitige Abgrenzung der drei Zellen vielfach eine weniger deutliche ist. Am besten ist gewöhnlich die den Schwesterkern des Polkerns enthaltende Antipodenzelle abgegrenzt (Fig. 8, 14, Taf. XVII), während zwischen den beiden anderen, kleineren und weniger differenzierten Kernen manchmal keine Trennungs-

wand wahrnehmbar ist. Die Antipoden sind gewöhnlich so gelagert, dass eine derselben die unterste Spitze des Embryosackes einnimmt und die beiden andern, mit den Kernen in ungefähr gleicher Höhe, nebeneinander liegen (Fig. 5, Taf. XIV und Fig. 7, 12, 14, Taf. XVII). Ausnahmsweise sind alle drei Zellen in eine kurze Reihe eingeordnet. Die nebeneinander liegenden und bald verschmelzenden Polkerne unterscheiden sich von den übrigen Kernen des Sackes durch bedeutendere Grösse (Fig. 6—8, Taf. XVII).

Während der Embryosackentwicklung findet auch ein starkes Wachstum der übrigen Teile der Samenanlage statt. Das innere Integument ist über den Scheitel des Nucellus emporgewachsen, das äussere Integument dagegen mit seinem Vorderrande in der Höhe des Eiapparates zurückgeblieben. Der Mikropylkanal wird infolge dessen einzig von dem inneren Integument gebildet (Fig. 3, Taf. XIV, Fig. 9, Taf. XVII). Eine auffallende Veränderung ist während der Differenzierung des Embryosackes mit der umgebenden Nucelluszellschicht erfolgt. Ihre Zellen werden zu Beginn des Embryosackwachstums zunächst stark gestreckt. Später degenerieren die Zellen einer mittleren Ringzone, während diejenigen am oberen und unteren Ende des Sackes erhalten bleiben. An dessen Scheitel entsteht so eine kleine Kappe aus Nucelluszellen, von welcher auf medianen Längsschnitten 3—5 Zellen sichtbar sind (Fig. 4—6, Taf. XIV). An der Basis des Embryosackes zeichnen sich die umgebenden Nucelluszellen schon auf frühen Stadien (Fig. 2, Taf. XVII) durch dichteres Plasma und stärker färbbare Kerne aus, sie bilden zusammen mit den Zellen der medianen Zellreihe sowie dem übrigen basalen Nucellusgewebe einen becherförmigen Zellkomplex, in welchen der Embryosack eingesenkt erscheint. Dieses basale Nucellusgewebe bleibt bis zur Ausbildung des reifen Samens mit all seinen Zellen völlig erhalten, während die scheitelständige Nucelluskappe bei der weiteren Entwicklung völlig verschwindet oder höchstens einige zusammengedrückte Zellreste zurück bleiben (Fig. 16, 17, Taf. XIV). Der Funiculus der Samenanlage hat sich stark verlängert; im

Gegensatz zu *B. candida* und auch *B. coelestis* wird er von einigen Tracheiden durchzogen, die sich von einem der Leitbündel der Ovariumachse bis zur Chalaza erstrecken.

3. Bestäubung und Befruchtung.

Über die Bestäubungs- und Befruchtungsvorgänge bei Burmanniaceen liegen bis jetzt nur wenige Angaben vor. Im Jahre 1889 schrieb ENGLER ¹⁾ bei der Bearbeitung der Burmanniaceen in den „Natürlichen Pflanzenfamilien“: „Zwar liegen über die Bestäubung bis jetzt keine direkten Beobachtungen vor, aber nach der Konstruktion der Blüten ist es zweifellos, dass Fremdbestäubung die Regel ist“ und 1911 heisst es bei WETTSTEIN ²⁾ immer noch: „Entomophilie höchst wahrscheinlich, Bestäubungsvorgänge wenig untersucht“. Auch in den Diagnosen und Beschreibungen der in den letzten Jahren aufgefundenen neuen, namentlich afrikanischen ³⁾ Vertreter der Burmanniaceen fehlen Angaben über Bestäubung entweder vollständig oder werden nur bei Beschreibung des Blütenbaues die Möglichkeiten einer Insektenbestäubung auseinandergesetzt und diskutiert. So weist z. B. nach ENGLER ⁴⁾ der Blütenbau von *Thismia Winkleri* darauf hin, dass bei der Entleerung der Antheren der Pollen nicht auf die Narbe der schüsselförmigen Griffelerweiterung, sondern auf den Grund des Kessels falle, in welchem auch kleine Dipteren gefunden wurden. Dies scheint ihm dafür zu sprechen, dass die Staubfäden nach dem Ausstreuen des Pollens sich aufrichten und die mit Pollen beladenen Insekten denselben entweder in den Narben derselben Blüte oder anderer weiter fortgeschrittener Blüten absetzen. Wahrscheinlicher erscheint ihm das letztere, doch muss, wie er hinzufügt, die Pflanze in der Natur weiter beobachtet werden, wobei auch darauf zu achten sein

1) ENGLER, A. und PRANTL, K., Die natürlichen Pflanzenfamilien II, 6. S. 45.

2) WETTSTEIN, R., Handbuch der syst. Botanik II. Aufl. 1911. S. 808/809.

3) Siehe bei SCHLECHTER, R., Burmanniaceae africanae. Botan. Jahrb. f. Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie. 38. Bd. 1907. S. 137—143.

4) ENGLER, A. *Thismia Winkleri* Engl., eine neue afrikanische Burmanniacee. Botan. Jahrb. f. Systematik, Pflanzengeschichte. u. Pflanzengeographie. 38. Bd. 1907. S. 91.

werde, ob nicht Pollen am unteren Ende der Anthere auskeimend am Konnektivfortsatz entlang zur Narbe hinwachsen. Bei *B. candida* und *B. Championii* nun haben wir Selbstbestäubung gefunden. Sie kommt bei diesen Arten nicht nur etwa gelegentlich dadurch zu Stande, dass bei ausbleibender Fremdbestäubung Pollen aus den geöffneten Antheren auf die Narbe fällt und hier keimt. Die Keimung der Pollenkörner beginnt vielmehr schon im Inneren der Antherenfächer und man sieht aus diesen ganze Bündel von Pollenschläuchen dem Konnektivfortsatz entlang der Narbe zuwachsen und zwischen deren Papillen eindringen. Unsere Feststellung typischer Autogamie bei *B. candida* und *B. Championii* ist übrigens nicht der erste, zuverlässige Beitrag zur Blütenbiologie der *Burmanniaceae*, sondern bildet nur eine Bestätigung älterer, merkwürdigerweise bis jetzt fast völlig unbeachtet gebliebener Beobachtungen an brasilianischen Vertretern der Familie.

Die nachträgliche Durchsicht der älteren floristisch-systematischen Burmanniaceenliteratur hat uns nämlich zu dem überraschenden Ergebnis geführt, dass schon im Jahre 1840 Autogamie bei einer *Burmanniacee* in vollkommen einwandfreier Weise festgestellt und beschrieben worden ist. Im Anschluss an die Diagnosen einiger neuer brasilianischer *Burmanniaceae* diskutiert MIERS ¹⁾ die Verwandtschaftsverhältnisse dieser Familie und schreibt dabei u. a.: „On examining the stigma of *Dictyostegia* after flowering, it will be found to be crowded with bundles of white cottony filaments, which may be seen even with a common lens to consist of pollen-tubes issuing in a body from the cells ²⁾ of the anthers and penetrating the stigma,

MIERS, J., On some new brasilian Plants allied to the natural order Burmanniaceae (Read March 3rd and 17th, 1840).

Transactions Linn. Society of London. Vol. 18. 1841. S. 535—556. Tafeln 37 u. 38. Zitat S. 551.

2) „Cells“ ist hier, wie auch aus den Figuren 1 c und 1 d Taf. 37 der Arbeit von MIERS hervorgeht mit „Pollensäcke“ zu übersetzen. Von den Figuren der zitierten Publikation, welche für Autogamie sprechen [1 d und 1 f Taf. 37, Transact. Linn. Soc. Vol. 18] sind zwei in ENGLERS Bearbeitung der Burmanniaceae [Natürl. Pflanzenfamilien II. 6. S. 49. Fig. 35 Fund G] reproduziert worden.

leaving their ends exerted, and clavately terminated by their respective grains." Eine weitere auf das Vorkommen von Autogamie bei *Burmanniaceae* verweisende Angabe findet sich in einer späteren Arbeit¹⁾ desselben Autors, in welcher er im Anschluss an die Beschreibung einer neuen Burmanniaceengattung eingehend die Bedeutung des Pollens und der Pollenschläuche für die Samenbildung diskutiert. Nachdem er erwähnt hat, dass in der Blüte der Burmanniaceen die Sexualorgane in vollkommen normaler Weise ausgebildet und funktionsfähig seien, bemerkt er weiter (S. 466): „In some cases we see the pollen-tubes issuing from each anther-cell (Pollensack) and brought into contact with a 3-lobed stigma provided with papillose surfaces.”

Die Richtigkeit der MIERS'schen Angaben ist in einer späteren Arbeit WARMING's²⁾ über einige brasilianische Burmanniaceen völlig bestätigt worden. Zur Blütenbiologie von *Dictyostegia umbellata* MIERS bemerkt er nämlich (S. 185): „Il est certain que des grains de pollen germent dans les anthères ouvertes et, probablement, les tubes polliniques sont-ils capables de pénétrer de là dans le stigmate; mais d'autres grains commencent par être transportés directement des anthères sur le stigmate de la même fleur avant de germer. Le transfert du pollen sur le stigmate est facilité par l'égalité de niveau qui existe entre celui-ci et les anthères. La plante est, sans aucun doute, autogame.”

Bei der von MIERS untersuchten *Dictyostegia orobanchioides* MIERS kommt WARMING zum selben Ergebnis und auch bei *Apteria lilacina* ist nach seiner Beschreibung Autogamie Regel: „Le stigmate se trouve, encore une fois, à la même hauteur que les anthères et plonge même parfois dans le pollen, ce qui fait que les grains germant pendent en masses compactes à l'extrémité du style.”

1) MIERS, J., On *Myostoma*, a new genus of the Burmanniaceae (Read June 7th, 1866). Transactions Linn. Society of the London. Vol. 25. 1866. S. 461—475. Tafel 57.

2) WARMING, E., Sur quelques Burmanniacées recueillies au Brésil par le Dr. A. Glaziou. Oversigt over det kong. danske Videnskabernes Selskabs Forhandlingar. 1901. N^o. 6. (Séance 13. Mai 1898) S. 173—188. Pl. 3 und 4. 6 Textfiguren.

Aus diesen Angaben von MIERS und WARMING, sowie unseren eigenen Befunden geht also hervor, dass wenigstens in der Unterfamilie der *Euburmanniaceae*, zu welcher die Gattungen *Dictyostegia*, *Apteria* und *Burmannia* gehören, Autogamie verbreitet zu sein scheint. Dies regt an, auch bei Vertretern der *Thismieae* und *Corsieae*, wie es ENGLER für *Thismia Winkleri* getan hat, Autogamie ernstlich in Frage zu ziehen, so weit bei denselben wenigstens (für *Th. javanica* und *Th. clandestina* haben wir bereits das Gegenteil wahrscheinlich gemacht) die Samenbildung überhaupt noch von Bestäubung und Befruchtung abhängig ist.

Das Wachstum der Pollenschläuche von *B. candida* und *B. Championii* geht völlig normal durch den Griffelkanal vor sich, an dessen Wänden die Schläuche zu Hunderten zwischen den leicht vorgewölbten Oberflächenzellen wahrgenommen werden und zwar zu einer Zeit, da in den Samenanlagen des Fruchtknotens erst zwei- bis vierkernige Embryosäcke vorhanden sind. In grosser Zahl werden Pollenschläuche auch in der Fruchtknotenöhle, an der Oberfläche der Plazenten gefunden. Infolge der stark anatropen Krümmung der Samenanlagen liegen die Mikropylen meistens in unmittelbarer Nähe der papillenbesetzten und die Pollenschläuche leitenden Plazenten. Da der Mikropylkanal sehr eng ist, schmiegt sich der befruchtende Pollenschlauch dessen Wänden so dicht an, dass man auf späteren Stadien von demselben gewöhnlich nur noch das Stück zwischen Plazenta und Mikropylöffnung und das innerste, am Scheitel des Embryosackes, deutlich wahrnimmt (Fig. 9, Taf. XVII). Die Befruchtungsvorgänge selbst vollziehen sich bei beiden Arten in der für die Angiospermen üblichen Weise. Der Pollenschlauch drängt sein fortwachsendes Ende zwischen den lockeren Zellen der einschichtigen Nucellarkappe hindurch (Fig. 1—3, Taf. XV und Fig. 9, Taf. XVII) und entleert seinen Inhalt entweder im Embryosackraum an der Oberfläche einer Synergide, oder in eine Synergide hinein. Von den beiden generativen Kernen dringt der eine in die Eizelle ein, der andere wird zu den beiden gewöhnlich in geringer Entfernung vom Eiapparat liegenden Polkernen getragen (Fig. 3—6,

Taf. XV). Die Vereinigung von Polkernen und Spermakern, sowie die Teilung ihres Vereinigungsproduktes, des sekundären Embryosackkernes, erfolgt sehr rasch. Leider ist es in keinem einzigen Falle gelungen, Stadien aus dem Verlauf der ersten Teilung des sekundären Embryosackkerns aufzufinden. In allen Präparaten, welche Befruchtungsstadien enthalten, sind merkwürdigerweise neben Samenanlagen, in denen erst unmittelbar vor der Fixierung die Entleerung des Pollenschlauchinhaltes erfolgt war, nur noch solche mit nebeneinander liegenden Geschlechtskernen vorhanden, ferner Stadien, die den in Fig. 10—14, Taf. XV dargestellten entsprechen, in welchen also schon eine oder sogar zwei Teilungen des sekundären Embryosackkerns vollzogen sind. Die Vereinigung von Eikern und Spermakern dagegen nimmt längere Zeit in Anspruch und in allen Stadien mit zwei oder vier Endospermkernen (Fig. 10—12, Taf. XV) ist die Zusammensetzung des Zygotenkernes aus zwei noch nicht völlig verschmolzenen Kernen deutlich wahrnehmbar. Die mit einem solchen Doppelkern versehenen Eizellen unterscheiden sich in ihrer Grösse und Gestalt stark von den noch nicht befruchteten Eiern. Wie schon angeführt worden ist, enthält der ausgebildete Embryosack von *B. candida* und *B. Championii* einen Eiapparat, der demjenigen des typischen Embryosackes der Angiospermen völlig entspricht. In den Synergiden sind die Vakuolen scheidelständig, der Kern gegen die Ansatzstelle der Zelle an der Embryosackwand hin gelagert. In der Eizelle (z. B. Fig. 7 und 8, Taf. XVII) dagegen nimmt der Kern mit dem grösseren Teil des Zytoplasmas den breiten, dem Embryosackinneren zugekehrten Scheitel ein, während der Saftraum an der Basis liegt. Im Vergleich zur Eizelle ist nun die einzellige Embryoanlage stark verkürzt. Ihr Saftraum ist völlig oder bis auf eine kleine Vakuole verschwunden, der Zellraum dicht mit Plasma und Kern erfüllt. Gestalts- und Volumenänderung beruhen wohl auf der Ausstossung des Zellsaftes und der Kontraktion des Plasmas der Eizelle. Ob diese Veränderung aber vor dem Eindringen des Spermakernes erfolgt ist, oder als eine Folge desselben zu betrachten ist,

konnte nicht entschieden werden. Jedenfalls handelt es sich hier um eine Erscheinung, welche in einer Detailuntersuchung noch eingehender erforscht werden sollte. Ebenso muss an dieser Stelle auf eine weitere, namentlich in Präparaten von *B. Championii* beobachtete Eigentümlichkeit aufmerksam gemacht werden. Nach der Vereinigung von Eikern und Spermakern liegt an der Oberfläche des Keimkernes (Fig. 10, Taf. XVII) häufig eine dunkler als das umgebende Cytoplasma gefärbte Masse. Bei schwächerer Vergrößerung glaubt man einen Spermakern an der Oberfläche des Eikerns zu sehen, bei den mit den Zeiss'schen homogenen Immersionen 2 mm und 1.5 mm gegebenen schönen Auflösungen ist aber sofort ersichtlich, dass diesem Anhängsel nicht Kernnatur zukommt, sondern dass es cytoplasmatischer Natur sein muss. Über den Ursprung dieser in zahlreichen Präparaten wahrnehmbaren Ansammlung können höchstens Vermutungen geäußert werden. Es ist möglich, dass es sich hier um das Auftreten kompakter Massen zellfremden Plasmas, Embryosackplasma, Synergidenplasma, Plasma des Pollenschlauches oder der generativen Zelle handelt, welches mit dem generativen Kern in die Eizelle eingedrungen ist und sich mit deren Plasma nicht mischt, oder wenigstens auf diesem Stadium noch nicht vermischt hat. Sichere Anhaltspunkte über den Ursprung dieses Plasmas zu finden ist natürlich nicht leicht, vielleicht sogar unmöglich. Es erübrigt also vorläufig auch, die Bedeutung zu diskutieren, welche dieser Wahrnehmung eventuell in befruchtungstheoretischer Hinsicht zukommen könnte. Vielleicht wird darauf zurückzukommen sein, wenn ähnliche Beobachtungen auch bei anderen Pflanzen gemacht werden.

Die Synergiden gehen während oder nach dem Befruchtungsakte zu Grunde, nur ausnahmsweise ist die eine derselben zusammen mit den Resten des Pollenschlauches noch längere Zeit neben der Keimzelle am oberen Ende des Embryosackes vorhanden. Auch solche zunächst noch erhalten bleibende Synergiden sind, wahrscheinlich ebenfalls infolge Saftverlustes vor oder während des Befruchtungsaktes, kleiner geworden.

4. *Endosperm- und Embryobildung, Entwicklung des reifen Samens.*

Endosperm- und Embryoentwicklung stimmen bei allen bis jetzt untersuchten Burmanniaceen sowohl in der geringen Entwicklung des Embryos wie seines Nährgewebes überein. Bei *B. candida* und *B. Championii* entwickelt sich, für *B. candida* ist das schon von TREUB gezeigt worden, der Embryo nur zu einem drei- höchstens vierzelligen kleinen Körper, der am Scheitel des ebenfalls wenigzelligen Endosperms eingebettet ist. Die Endospermbildung geht der Embryobildung voraus und ist häufig schon vor der ersten Teilung der Keimzelle zum Abschlusse gelangt. Trotz der wenigen zur Endospermbildung notwendigen Teilungen ist deren Verlauf weder von TREUB noch von JOHOW genau festgestellt worden. Noch in neuester Zeit hat MEYER (l. c. S. 10 und Figur 35—36) auf Grund einer lückenhaften Beobachtungsserie an *Thismia javanica* von den ersten Stadien der Endospermentwicklung eine unrichtige Darstellung gegeben, indem er zwei zu Beginn der Endospermbildung an der Basis des Embryosackes entstehende Zellen als Antipoden ansprach. Es sollen daher die zur Endospermbildung führenden Entwicklungsvorgänge im nachfolgenden eingehend besprochen werden.

Wie schon erwähnt worden ist, sind Anhaltspunkte dafür vorhanden, dass der sekundäre Embryosackkern schon bald die erste Teilung erfährt. Der Teilungsvorgang selbst ist nicht beobachtet worden. Es geht aber aus dem Aussehen der Teilungsprodukte deutlich hervor, dass dieser ersten Teilung jedenfalls keine Verschmelzung der chromatischen Substanz der drei Kerne vorausgegangen ist. Die beiden ersten Endospermkerne sind vielfach wieder dreiteilig und zeigen später drei Kernkörperchen (Fig. 10—13, Taf. XV und Fig. 16, Taf. XVII). An einzelnen dieser dreiteiligen Kerne (Fig. 13, Taf. XV) kann ganz deutlich wahrgenommen werden, dass jeder seiner Komponenten ein selbständiges Chromatinfadennetz aufweist und die drei Chromatinkörper sich im Innern des ungeteilten Kernraumes deutlich

gegeneinander abgrenzen. Diese Bilder werden jedenfalls am einfachsten durch die Annahme erklärt, dass bei den Vorbereitungen zur ersten Teilung die Chromosomen der drei nur äusserlich verschmolzenen Kerne sich als besondere Gruppen in die gemeinsame Kernteilungsfigur einstellen und ihre Tochterchromosomen in den Teilungsprodukten wiederum zur Bildung getrennter Fadennetze zusammentreten. Die Dreiteiligkeit des chromatischen Inhaltes ist auch später noch aus dem Vorhandensein von drei Kernkörperchen und aus dem gebuchtet bleibenden Umriss dieser Kerne zu erkennen. Es geben diese Beobachtungen also einen weiteren, hübschen Beleg für die Richtigkeit der in grossen Kreisen der Cytologen herrschenden Ansicht, von der Erhaltung der Individualität väterlicher und mütterlicher Chromosomen in den Abkömmlingen der aus der Vereinigung von Geschlechtszellen entstandenen Zygotenkerne. Von besonderem Interesse ist dabei, dass es sich um den ungewöhnlichen Fall handelt, dass der Zygotenkern statt aus zwei aus drei Kernen hervorgegangen ist.

Von den beiden Tochterkernen der ersten Teilung nimmt, wie bei *Thismia javanica*, der eine sofort am unteren Ende des Embryosackes unmittelbar über den Antipoden Aufstellung, während der andere im seitlichen Wandbelage nach oben, gegen die Keimzelle hin wandert (Fig. 12 Taf. XV).

Der basale Tochterkern wird hierauf mit dem umgebenden Plasma durch eine nach oben vorgewölbte Querwand vom grösseren, oberen Teil des Embryosackes abgeteilt und bildet die *Basal-oder Haustoriumzelle* (Fig. 10, 11 Taf. XV und Fig. 13 Taf. XVII), deren Entstehung wir schon für die *Thismia*arten beschrieben haben. Die frühzeitige Bildung einer basalen Endospermzelle, während nachher im oberen Teile des Embryosackes die freien Kernteilungen wieder aufgenommen werden, bildet die wichtigste Abweichung der Endospermbildung von *Burmannia* vom gewöhnlichen Entwicklungsgang im Embryosacke der Angiospermen. Sie ist von um so grösserem Interesse, als das weitere Verhalten dieser basalen Endospermzelle bei den einzelnen Gattungen und Arten der Familie verschieden ist und sich vielleicht eine ähn-

liche Reihe von Ausbildungsformen des Basal-oder Haustorialapparates wird feststellen lassen, wie es z. B. ED. SCHMID (l. c. S. 277) bei den Scrophulariaceen möglich gewesen ist.

Bei den *Thlismia*-arten wird diese basale Zelle nach vorausgegangener karyokinetischer Teilung des Kerns durch eine Längsteilung in zwei nebeneinander liegende Tochterzellen geteilt. Bei den beiden *Burmanni*-arten bleibt diese Zellteilung aus. Bei *B. candida* erfolgt zwar in der Basalzelle in der Regel noch eine Kernteilung, während bei *B. Championii* die Basalzelle häufig einkernig bleibt. Die geringe Teilungstätigkeit, welche dem unteren der beiden aus der ersten Teilung des sekundären Embryosackkerns hervorgehenden Tochterkerne im Vergleich zu seinem Schwesterkerne zukommt, ist vielleicht die Ursache, dass seine auffallenden Strukturverhältnisse besonders lange beibehalten werden. Das Plasma der Basalzelle ist dicht, in jungen Stadien hie und da etwas vakuolig (Fig. 15 Taf. XVII). Der Kernteilungsschritt, durch welchen bei *B. candida* diese Zelle zweikernig wird, erfolgt in den einen Embryosäcken gleichzeitig mit der nächsten Teilung des oberen, freien Schwesterkerns, in anderen erst, wenn im Embryosackraume schon vier bis acht freie Kerne vorhanden sind (Fig. 6, 9 Taf. XIV). Es sind auch Embryosäcke zur Beobachtung gelangt, in welchen schon die Endospermzellen gebildet waren, die Basalzelle aber noch einkernig war. Bei *B. Championii* dagegen erfolgt die Kernteilung in der Basalzelle verspätet oder bleibt sogar ganz aus. (Fig. 15, 16 Taf. XVII).

Bei beiden Arten aber nimmt die Basalzelle in späteren Stadien diejenige Struktur an, die JONOW bei der Untersuchung westindischer und brasilianischer Burmanniaceen an der untersten Endospermzelle älterer Embryosäcke aufgefallen ist. Es bilden sich nämlich im Plasma derselben eine grössere Zahl von unten nach oben verlaufender Zellulosebalken aus, welche den Zellraum in nebeneinander liegende, schmale Fächer gliedern (Fig. 11—13, 15 Taf. XIV).

1) SCHMID, ED., Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Scrophulariaceae. Beih. z. botan. Centralblatt Bd. XX, 1906. S. 175—299. 3 Tafeln. 58 Textfiguren.

Nach der Abgrenzung der Basalzelle teilt sich der im Embryosackraum verbliebene Schwesterkern bald aufs neue und seine beiden Abkömmlinge nehmen am oberen und unteren Ende des Embryosackes Aufstellung (Fig. 14 Taf. XV). Rasch folgt eine weitere Teilung, welche an jedem Ende des Sackes zunächst zwei Kerne erzeugt (Fig. 15, 16 Taf. XVII) und schliesslich ein dritter Teilungsschritt. Aus der Durchmusterung zahlreicher Präparate geht hervor, dass die Achtzahl der Kerne einige Zeit konstant bleibt. Sie verteilen sich in gleichmässigen Abständen in dem dichter werdenden Plasma, das um die einzelnen Kerne bald eine strahlige Anordnung, die Vorbereitungen zur Zellbildung erkennen lässt. Diese folgt in kleineren Samenanlagen schon im Achtkernstadium, in grösseren nach einem oder höchstens zwei weiteren Kernteilungsschritten nach. Die Anzahl der durch simultane Zellbildung entstehenden Endospermzellen ist also stets eine beschränkte. Ihre Zahl wird später durch keine weiteren Teilungen mehr vermehrt, so dass auch in viel älteren Stadien auf Längsschnitten nur sechs bis acht in der Mittellinie des Sackes aneinandergrenzende Endospermzellen sichtbar sind. Auch die Kerne dieser Zellen erfahren keine weiteren Teilungen und beginnen während der Ansammlung der Reservestoffe zu degenerieren. In dem zuerst leicht schaumigen Cytoplasma bilden sich, besonders reichlich um den Kern, grössere und kleine Ölkugeln aus. Ausserdem führt der Inhalt älterer Endospermzellen Stärke und weitere Mengen von Kohlehydraten werden in Form von Reservecellulose in den stark verdickten Wänden der Endospermzellen gespeichert.

Der Embryo bleibt bei *B. candida* und *B. Championii* klein und wenigzellig. Eine Querwand teilt die Keimzelle, gewöhnlich erst nachdem die Endospermbildung schon zum Abschluss gelangt ist, zunächst in eine basale und eine scheideständige Zelle (Fig. 11 und 12 Taf. XIV), von denen die letztere sich meistens noch einmal durch eine Wand in der Richtung der Längsachse des Embryosackes teilt (Fig. 13 Taf. XIV). Hie und da erfährt auch die Basalzelle eine weitere Teilung und zwar durch eine Querwand, so dass sich dann der Embryo (Fig. 14 Taf. XIV) aus

zwei einzelligen und einer zweizelligen Etage zusammensetzt. Diese letztere Teilung allerdings ist bei *B. candida* sehr selten. Wir haben sie nur in zwei Fällen beobachtet und TREUB gibt in seiner Mitteilung über diese Species ebenfalls an, nicht völlig sicher eine Querwand in der oberen der beiden Zellen beobachtet zu haben. Im völlig reifen Samen sind die Embryozellen dünnwandig, mit homogenem, feinkörnigem Plasma versehen und dadurch wie auch infolge ihrer viel kleineren Dimensionen von den dickwandigen, körnerreichen Endospermzellen schon bei schwacher Vergrößerung auf den ersten Blick zu unterscheiden. Die nach der Befruchtung hie und da noch erhalten gebliebene eine Synergide ist schon vor der Endospermzellbildung mit den Resten des Pollenschlauches aufgelöst worden, so dass innerhalb des dickwandigen und häufig über die Ansatzstelle des Embryos hinausragenden Endospermkörpers nur der Embryo eingeschlossen ist (Fig. 11—14 Taf. XIV).

Während der Endosperm- und Embryoentwicklung gehen auch Veränderungen an den äusseren Teilen der Samenanlage vor sich. Das äussere Integument und der Funiculus der Samenanlage erfahren starkes Wachstum, ebenso findet eine starke Streckung aller Zellen in der Chalazaregion des reifenden Samens statt. Auf der Mikropylenseite entstehen so zwei lange, fadenförmige Anhängsel, das eine aus dem gestreckten Funiculus, das andere aus dem jenem ungefähr parallel laufenden, äusseren Integument. Ein drittes Anhängsel geht auf der gegenüber liegenden Seite aus der ebenfalls stark verlängerten Chalazapartie hervor. Am ausgewachsenen Samen setzen sich die drei flügelartigen Fortsätze aus inhaltsarmen oder völlig leeren, durchsichtigen Zellen zusammen (Fig. 16 und 17 Taf. XIV). Ein Querschnitt durch eine fast ausgereifte Frucht zeigt infolge der eigentümlichen Formänderung der Samen ein ganz anderes Bild als auf früheren Stadien. Während in jüngeren Fruchtknoten die kurzgestielten, stark anatropen Samenanlagen an der Oberfläche der Plazenten sitzen und zwischen denselben und der Fruchtknotenwand ein weiter Hohlraum offen ist, erscheinen in den reifenden Früchten die Samen im ganzen Hohl-

raum des Fruchtknotens verteilt. Die stark verlängerten Funiculi sind hin und her gebogen, so dass die breiten Endospermkörper der Samen in verschiedenen Abstand von den Plazenten zu liegen kommen.

Das innere Integument des Samens hat an diesen späten Wachstumserscheinungen keinen Anteil. Seine Zellen erfahren eine geringe Verdickung der Membran und meistens eine intensive Bräunung des körnig werdenden Inhaltes. Die kleine Nucelluskappe am Scheitel des Embryosackes ist im reifen Samen meistens verschwunden. Die den Endospermkörper abgrenzende Wand des inneren Integumentes wird ähnlich den Endospermzellwänden stark verdickt und nimmt überdies infolge starker Kutinisierung einen bräunlichen Farbenton an. Diese dicke, kutinisierte Membran überzieht den Endospermkörper zusammen mit dem seine Basis umgebenden becherförmigen Rest des Nucellusgewebes (Fig. 12 Taf. XIV), der auch im reifen Samen, meistens mit stark verdickten und verholzten Wänden, erhalten bleibt. In den unmittelbar unter der Basalzelle liegenden Nucelluszellen bleiben Plasma und Kern bis zur Samenreife erhalten. Aus dem Umstand, dass dieser Gewebekomplex zusammen mit dem Endosperm von der kutinisierten, nach aussen abschliessenden Hülle umschlossen wird, scheint hervorzugehen, dass zwischen den beiden Geweben noch bis in späte Entwicklungsstadien Stoffleitungsvorgänge erfolgen. JOHOW vermutete, dass die an der Basis des Endospermkörpers vorkommenden, besonders gestalteten Zellen zusammen mit dem Nucellarbecher bei der Keimung eine von ihm allerdings nicht weiter angedeutete Rolle spielen würden. Eine solche Funktion bei der Keimung ist natürlich, auch wenn die Hauptbedeutung jenes Gewebes auf seiner Funktion während der Samenbildung beruhen wird, keineswegs ausgeschlossen. Möglich wäre z. B., dass bei Beginn der Keimung die Wasseraufnahme in die inneren Gewebe, Endosperm und Embryo, aus den äusseren, durchlässigen Geweben des Samens, durch dieses Gewebe erfolgt, da ja an der ganzen übrigen Oberfläche des Endosperms eine Wasseraufnahme infolge der starken Cutinisierung erschwert ist.

Die reifen Früchte von *B. candida* und *B. Championii* öffnen sich derart (VII 1911 S. 80), dass die ganze obere Hälfte der Fruchtknotenwand mit den noch verbliebenen Resten der Blütenhülle mittels Querrissen abgeworfen wird. Die zahlreichen Sämchen liegen dann frei an der Oberfläche der Plazenten. Ihre dünnwandigen und ausgetrockneten Funiculi lösen sich leicht von den Plazenten los. Die Verbreitung der ausserordentlich leichten und zudem mit Fluggeweben versehenen Sämchen dürfte durch den Wind erfolgen.

Zürich, September 1911.

FIGURENERKLÄRUNGEN ZU TAFEL XIII—XVII.

TAFEL XIII.

Burmannia candida Engl.

(Bei der Reproduktion ist diese Tafel auf 2/3 Seitenlänge reduziert worden. Die Vergrößerungsangaben für die einzelnen Figuren beziehen sich auf die Originalzeichnungen. Bei Messungen an den Figuren dieser Tafel sind also die Masse mit 3/2 zu vervielfachen, damit sie der angegebenen Vergrößerung entsprechen).

- Fig. 1.** Junge Samenanlage mit einer axilen Reihe von Innenzellen und einer peripherischen Zellschicht. Vergr. $960/1$.
- Fig. 2–4.** Kernteilungsbilder aus Innenzellen junger Samenanlagen. Fig. 2. Vergr. ca. $1500/1$. Fig. 3 u. 4. Vergr. $960/1$.
- Fig. 5 u. 6.** Die oberste Zelle der axilen Zellreihe wächst zur Embryosackmutterzelle heran. Durch Teilungen in der peripherischen Zellschicht (Fig. 6) werden an der Basis der jungen Samenanlagen die Initialen der Integumente gebildet. Verg. $960/1$.
- Fig. 7–12.** Verschiedene Stadien aus dem Verlauf der ersten Kernteilung in der Embryosackmutterzelle. Vergr. $960/1$.
- Fig. 13.** Junge Samenanlage mit beginnender Integumentbildung; Embryosackmutterzelle in Teilung begriffen. Vergr. $960/1$.
- Fig. 14 u. 15.** Junge Samenanlagen nach der ersten Teilung der Embryosackmutterzelle. Die obere der beiden Schwesterzellen ist kleiner als die untere und wird von derselben verdrängt. Vergr. $960/1$.
- Fig. 16.** Junge, stark anatrope gekrümmte Samenanlage. Die Ränder des inneren Integumentes sind schon weit gegen den Nucellusscheitel vorgewachsen; das äussere Integument wird nur auf der dem Funiculus entgegengesetzten Seite angelegt. Die untere der beiden aus der Embryosackmutterzelle hervorgegangenen Tochterzellen hat sich unter Verdrängung der oberen zum zweikernigen Embryosacke entwickelt. Vergr. $960/1$.
- Fig. 17.** Nucellusscheitel mit vierkernigem Embryosacke. Die Schwesterzelle des letzteren ist schon völlig verdrängt worden. Vergr. $960/1$.

TAFEL XIV.

Burmannia candida Engl.

(Bei der Reproduktion ist diese Tafel auf 2/3 Seitenlänge reduziert worden. Die Vergrößerungsangaben für die einzelnen Figuren beziehen sich auf die Originalzeichnungen. Bei Messungen an den Figuren dieser Tafel sind also die Masse mit 3/2 zu vervielfachen, damit sie der angegebenen Vergrößerung entsprechen).

- Fig. 1 u. 1a.** Achtkerniger Embryosack vor Beginn der Zellbildung. Vergr. $960/1$.
- Fig. 2, 2a, 2b.** Achtkerniger Embryosack mit Eizelle, Synergiden, 3 Antipoden und den im unteren Teil des Sackes neben einander liegenden Polkernen. Vergr. $960/1$.

- Fig. 3, 3a, 4.** Embryosäcke nach erfolgter Zellbildung. Bei der vorhergegangenen Streckung des Embryosackes ist die einzellige Nucellusschicht an seiner Oberfläche in einer mittleren Zone aufgelöst worden. Die verbreiterten Ränder des innern Integumentes haben sich über dem Scheitel der einschichtigen Nucelluskappe bis auf einen engen Mikropylkanal geschlossen. Vergr. $500/1$.
- Fig. 5.** Embryosack nach Vereinigung der beiden Polkerne. Zwischen Eizelle und einer Synergide das Ende eines noch nicht geplatzen Pollenschlauches. Vergr. $500/1$.
- Fig. 6.** Embryosack nach Beginn der Endospermibildung. Basis und Scheitel des Embryosackes von kleinen Nucelluskappen umhüllt. Am Grunde des Embryosackes die drei degenerierenden Antipoden, darüber die plasmareiche, zweikernige Haustoriumzelle, die gegen den übrigen Embryosackraum durch eine stark färbbare Zellwand abgetrennt ist. Vier Endospermkerne in Teilung (im gezeichneten Schnitt davon drei sichtbar). Am Scheitel des Sackes der noch einzellige Embryo. Vergr. $500/1$.
- Fig. 7 u. 8.** Teilungsfigur des Kerns in der Embryozelle. Vergr. $960/1$.
- Fig. 9.** Samenanlage nach Beginn der Endospermibildung, 4 freie Endospermkerne. Vergr. $500/1$.
- Fig. 10.** Mittlerer Teil eines jungen Samens mit grosszelligem, innerem Integument und Nucellusresten an Scheitel und Basis des Embryosackes. An der Basis des letzteren die zweikernige Haustoriumzelle, darüber grosse Endospermzellen; der scheitelständige Embryo noch ungeteilt. Vergr. $500/1$.
- Fig. 11 u. 12.** Embryosäcke mit zweizelligen Embryonen, Haustoriumzelle mit leistenförmigen Membranverdickungen. Vergr. $500/1$.
- Fig. 13 u. 14.** Embryosäcke mit drei- und vierzelligen Embryonen Vergr. $500/1$.
- Fig. 15.** Basis eines Embryosackes, Haustoriumzelle mit beginnender Leistenbildung. Vergr. $500/1$.
- Fig. 16 u. 17.** Uebersichtsbilder reiferer Samen. Durch starke Streckung der Zellen von Funiculus, äusserem Integument und der Chalaza-region entstehen am mittleren, den Embryosack enthaltenden Teil des Samens flügelartige Fortsätze. Fig. 16. Vergr. $225/1$; Fig. 17. Vergr. $115/1$.

TAFEL XV.

Burmannia candida Engl.

Alle Figuren dieser Tafel sind mit Zeiss homogene Immersion 2 mm num. Ap. 1.3 Tubus 160 mm und dem Zeichenokular von Leitz gezeichnet worden. Vergr. $660/1$.

- Fig. 1.** Embryosack mit Pollenschlauch. Das erweiterte Pollenschlauchende nimmt die Stelle einer Synergide ein; die Polkerne liegen am Scheitel der zweiten Synergide und der Eizelle (Diese ist in einem dem gezeichneten Schnitte nachfolgenden enthalten).
- Fig. 2 – 6.** Befruchtungsstadien: Vereinigung von Spermakern und Eikern und der in der Nähe der Eizelle liegenden Polkerne mit dem zweiten Spermakern.
- Fig. 7.** Dreiteiliger Kern, aus der Vereinigung der beiden Polkerne und eines Spermakerns entstanden.
- Fig. 8.** Embryozelle mit Keimkern; die Entstehung aus Eikern und Spermakern ist noch aus dem Vorhandensein von zwei Nukleolen ersichtlich.
- Fig. 9.** Pollenschlauchende neben einer Synergide.
- Fig. 10.** Unteres Ende des Embryosackes nach der ersten Teilung des sekundären Embryosackkernes. Zu unterm zwei Antipodenzellen mit degenerierenden Kernen, darüber die noch

einkernige Haustoriumzelle und der eine der zwei ersten freien Endospermkerne im basalen Wandbelag der grossen Embryosack-Restzelle. Der letztere lässt in der Anordnung seiner chromatischen Substanz die Abstammung von dem aus drei Kernen zusammengesetzten sekundären Embryosackkerne deutlich wahrnehmen.

Fig. 11 u. 12. Embryosäcke nach der ersten Teilung des sekundären Embryosackkernes. Die Gestalt der beiden Tochterkerne deutet darauf hin, dass selbst nach der ersten Teilung noch

keine völlige Mischung der chromatischen Substanz der im sekundären Embryosackkern vereinigten Kerne erfolgt ist. Eikern und Spermakern sind ebenfalls noch nicht vollkommen mit einander vereinigt.

Fig. 13. Antipodenende eines Embryosackes mit den drei Antipodenkernen und dem deutlich dreiteiligen Kern der Haustoriumzelle.

Fig. 14. Embryosack mit Eizelle, einer Synergide, zwei Antipoden, der Haustoriumzelle, sowie zwei freien Endospermkernen.

TAFEL XVI.

Burmannia Championii Thw.

Alle Figuren dieser Tafel sind mit Zeiss Tubus 160 mm und dem Zeichenokular von Leitz gezeichnet worden. Vergr. $660/1$.

Fig. 1. Scheitel einer jungen Samenanlage mit grosser Embryosackmutterzelle. Präsynaptischer grosser Kern mit körnerreichem Chromatinfadennetz.

Fig. 2—4. Verschiedene Stadien aus dem Verlauf der heterotypischen Kernteilung in der Embryosackmutterzelle. Die achromatische Figur ist breit tonnenförmig. Die einzelnen Fasern sind stark gefärbt, an den Enden nicht zusammen neigend.

Fig. 5. Stadium der Zellplatte nach Verlauf der ersten Kernteilung. Die Embryosackmutterzelle wird durch die in Bildung begriffene Querwand in zwei ziemlich gleich grosse Tochterzellen geteilt.

Fig. 6. Embryosackmutterzelle durch eine deutlich wahrnehmbare Wand in zwei Tochterzellen geteilt, von denen die basale etwas grösser ist. Tochterkerne mit kleinem Kernkörperchen und zahlreichen Chromatinkörnern unter der Kernwand.

Fig. 7. Kernteilung in den beiden Tochterzellen im Stadium der Äquatorialplatte. Achromatische Fasern in beiden Figuren spitz endigende Spindeln bildend.

Fig. 8 u. 9. Vierzellige Tetraden. Die aus der oberen Tochterzelle hervorgegangenen Einzelzellen nebeneinander, die aus der unteren entstandenen übereinander. Die drei oberen Zellen mit ihren schon in Degeneration begriffenen Kernen werden durch die unterste, sich vergrössernde Zelle verdrängt.

Fig. 10—14. Stadien aus dem verkürzten Verlauf der Tetradenteilung:

Fig. 10. Von den beiden Tochterzellen wird die obere durch die untere verdrängt. Teilungswand schon stark in den Raum der oberen Zelle vorgewölbt.

Fig. 11. Kernteilung in der stark vergrösserten, unteren Tochterzelle.

Fig. 12. Die untere Tochterzelle hat sich in zwei ungleichgrosse Einzelzellen geteilt, von denen die kleinere später zusammen mit der oberen Tochterzelle verdrängt wird.

Fig. 13 u. 14. Verdrängung und Auflösung der beiden oberen Zellen durch die zum Embryosack auswachsende unterste Zelle der unvollständigen (dreizelligen) Tetrade.

TAFEL XVII.

Burmannia Championii Thw.

Alle Figuren dieser Tafel sind mit Zeiss homogene Immersion 2 mm num. Ap. 1.3 Tubus 160 mm und dem Zeichenokular von Leitz gezeichnet worden. Vergr. $\frac{600}{1}$.

- Fig. 1.** Zweikerniger Embryosack mit grosser, zentraler Vacuole. Über dem Embryosack die beiden anderen Zellen der Tetrade in degeneriertem Zustande.
- Fig. 2.** Nucellus aus junger Samenanlage mit vierkernigem Embryosack. Schwestercellen des letzteren fast völlig aufgelöst.
- Fig. 3.** Kernteilungen am oberen Ende des vierkernigen Embryosackes.
- Fig. 4.** Achtkerniger Embryosack kurz nach vollzogener dritter Teilung. Die Kerne noch in Paaren geordnet. Die beiden Synergidenkerne sind etwas grösser als Eikern und Polkern. Von den vier Kernen am Antipodenende sind diejenigen des unteren Paares etwas kleiner als die oberen, von denen der eine zum obern Polkern wird.
- Fig. 5.** Etwas älteres Stadium des achtkernigen Embryosackes mit noch freien Kernen.
- Fig. 6.** Beginn der Zellbildung im achtkernigen Embryosacke. Unter den drei Kernen des Eiendes sind Vacuolen sichtbar, die beiden Polkerne liegen neben einander, die drei Antipodenkerne sind kleiner als die übrigen Kerne des Embryosackes.
- Fig. 7 u. 8.** Achtkernige Embryosäcke nach erfolgter Zellbildung. In Fig. 7, am Eiende eine Synergide und die Eizelle. In Fig. 8 vollständiger Eiapparat, der fast die Hälfte des Embryosackraumes ausfüllt. In beiden Figuren Polkerne nebeneinander liegend. In Fig. 7 drei kleinkernige Antipodenzellen, in Fig. 8 deren zwei sichtbar.
- Fig. 9.** Mikropylarende einer Samenanlage zur Zeit der Befruchtung. Die Samenanlage reicht mit den am Scheitel verbreiterten Rändern des inneren Integumentes bis an die Placenta hin. Der Pollenschlauch ist ausserhalb der Mikropyle und in ihrer innersten Partie deutlich sichtbar. Seine Spitze hat den einschichtigen Nucellus durchbrochen und ist bis in den Embryosackraum vorgedrungen. In der Embryozelle Vereinigungsstadium von Ei- und Spermakern.
- Fig. 10 u. 11.** Junge Embryozellen mit Resten der Synergiden. In Fig. 10 stark gefärbtes und abgegrenztes Plasma an der Oberfläche des Keimkerns.
- Fig. 12.** Embryosack nach der ersten Teilung des sekundären Embryosackkernes.
- Fig. 13.** Basales Ende des Embryosackes mit Antipoden, Haustoriumzelle und dem einen der beiden ersten freien Endospermkerne.
- Fig. 14.** Antipodengruppe und Haustoriumzelle. Eine Antipodenzelle deutlich durch eine Membran abgegrenzt, zwischen den beiden anderen Kernen ist keine Teilungswand sichtbar.
- Fig. 15.** Unteres Ende des Embryosackes mit zwei Antipodenzellen, der fast kugeligen und plasmareichen Haustoriumzelle und zwei freien Endospermkernen.
- Fig. 16.** Haustoriumzelle und zwei freie Endospermkerne. Der Kern der Haustoriumzelle ist deutlich dreiteilig und enthält drei verschieden grosse Nukleolen; in den beiden Endospermkernen dagegen sind nur je zwei Nukleolen sichtbar.

VERONICA JAVANICA BLÜME, EIN UBIQUIST TROPISCHER UND SUBTROPISCHER GEBIRGE.

VON

ERNST LEHMANN.

Wenn wir eine Pflanze von universeller Verbreitung finden, so wird es stets von Interesse sein, den Ursachen dieser Verbreitung nachzuspüren. Die Frage wird um so interessanter, wenn es sich um die universelle Verbreitung einer Pflanze innerhalb der Wendekreise handelt.

Befragen wir Autoren früherer Jahrzehnte, wie es mit universeller Verbreitung von Tropenpflanzen steht, so finden wir ganz allgemein die Angabe, dass die Tropenpflanzen nur in den allerseltensten Fällen durch beide Hemisphären hindurch gehen. In seiner *Géographie botanique raisonnée* 1855, Bd. 1, S. 564 und 584 bringt DE CANDOLLE eine Übersicht von universell verbreiteten Pflanzen. Er bringt aber nur 9 Arten zusammen, welche in den Tropen beider Hemisphären verbreitet sind und zudem sind diese 9 Arten fast ausschliesslich Pflanzen aus der Umgebung des Menschen oder Wasserpflanzen. In seinem Handbuch der Pflanzengeographie 1890, S. 106 sagt DRUDE: So sind fast alle Pflanzenarten, ja die überwiegende Anzahl der Gattungen, in den amerikanischen Tropen und in denen der alten Welt auf je einen Kontinent beschränkt.

Ich kann keineswegs etwa behaupten, einen Überblick darüber zu haben, wie weit heute die Kenntnis solcher allgemein verbreiteter, tropischer Pflanzen gediehen ist. Ich habe nur auf zwei Wegen der Beantwortung dieser Frage etwas näher zu kommen gesucht. Ich habe einmal einige

bekannte Bearbeiter z. T. tropischer Pflanzenfamilien befragt, ob ihnen eine universelle Verbreitung tropischer Pflanzen in ihren Gruppen bekannt ist. Z. B. sagte mir Herr Dr. STAPP, dass unter den Gramineen ausser Pflanzen aus der Umgebung des Menschen kaum solche Beispiele vorkämen. Für die Orchideen konnte Herr ROLFE ebenso höchstens auf ganz vereinzelte Fälle hinweisen, bei denen bei weiter tropischer Verbreitung in alter und neuer Welt die Mitwirkung des Menschen ausgeschlossen sei. Zudem ist von der Familie der Palmen die Trennung nach Kontinenten genugsam bekannt.

Der zweite Weg verschaffte mir nicht viel reichere Ausbeute, wengleich er auf nicht allzuvielen Fällen ausgedehnt wurde. Ich suchte im Kew Herbar von einzelnen Pflanzen Standorte aus den Tropen beider Hemisphären aufzufinden. Herr Dr. HOSSEUS machte mich auf die *Desmodium*-Arten aufmerksam, von denen ich auch wirklich in zwei Fällen universelle Verbreitung fand. So sah ich *Desmodium triflorum* aus den Tropen Indiens, Siams, Malayens und Centralamerikas. *Desmodium gangeticum* lag in vereinzelten amerikanischen neben indischen und polynesischen Standorten vor. Wie weit es sich aber hier um Verbreitung ohne Mitwirkung des Menschen handelt, das ist eine Frage, welche auch nur durch eingehende Behandlung der einzelnen Standorte beantwortet werden könnte.

Für die grosse Mehrzahl der Fälle gilt eben auch heute wohl noch der Satz, dass eine selbstständige Verbreitung einzelner Pflanzenspezies durch die Tropen beider Hemisphären sicher zu den Seltenheiten gehört. Wenn aber ein neuer Fall solcher universeller Verbreitung bekannt wird, dann lohnt es sich der Mühe, näher nachzuforschen und die Einzelheiten der Verbreitung festzustellen.

Es ist mir nun gelungen, in der Gattung *Veronica* eine Art ausfindig zu machen, deren Verbreitung sich über tropische und subtropische Gebiete beider Hemisphären erstreckt. Es handelt sich um *Veronica javanica* Blume, deren Verbreitungsbild bis heute allerdings noch ein recht lückenhaftes war und

erst durch die hier zur Darstellung gebrachten Untersuchungen lässt sich die weite Verbreitung erkennen. Es ist infolgedessen notwendig, ehe wir uns über die Verbreitungsmöglichkeiten näher auslassen können, das Verbreitungsareal und die Geschichte der Kenntnis der Art einer genaueren Betrachtung zu unterziehen.

Veronica javanica ist von BLUME (Bijdragen tot de Flora van Nederlandsch Indië 1826 S. 742) beschrieben worden. Er erwähnt sie daselbst vom Gipfel Sederato und von den Katarakten des Flusses Tjikundul am Berge Gede.

Am 6. / III 1836 hatte sodann GRIFFITH in Assam, in arvis versus Gubroo-Purbut Jorhauth eine *Veronica* aufgefunden, welche in den von JOHN MC. CLELLAND zusammengestellten Posthumous Papers (Calcutta 1854, Part IV, S. 127) ohne Speziesnamen beschrieben ist. Wie sich aus der Beschreibung und dem Originalexemplar, welches ich in Herb. Kew einsah, ergibt, handelt es sich hier um dieselbe Art, welche BLUME als *V. javanica* beschrieb. Damals wurde das indessen noch nicht gleich erkannt. Vielmehr liegen im Herbar Kew einige von MADDEN um diese Zeit bei Almora gesammelte Pflanzen, welche ursprünglich als *Lindenbergia ruderalis*, die habituell ausserordentlich ähnlich ist, bestimmt wurden. Weiter findet sich daselbst aus dem Jahre 1840 unter Nr. 46 eine von EDGEWORTH im Himalaya von 3–8000 Fuss Höhe gesammelte *Veronica*, ursprünglich als neue Spezies bezeichnet. Sie wurde dann, wie aus HOOKER, Fl. Ind. 1885, 4, S. 296 hervorgeht von Edgeworth mit dem Manuskriptnamen *V. Maddenii* belegt, unter welchem sie besonders noch in den 60 er Jahren in den Hookerschen Sammlungen aus Indien geht. Bald erkannte aber HOOKER dann die Identität der *Maddenii* mit der Blumeschen Pflanze und er führt nun *V. javanica* aus verschiedenen Teilen des Himalaya an. Auf die einzelnen Lokalitäten wird bald zurückzukommen sein.

Das Gebiet erweitert sich sodann nach N.O. durch eine von BALANSA in Tonkin am schwarzen Flusse gesammelte Pflanze, (Nr. 3579), deren Identität mit *V. javanica* ich im Kew Herbar feststellen konnte. Der genaue Standort ist leider nicht lesbar.

Er bildet die Vermittelung zu dem einzigen derzeit noch weiter aus dem Osten als *V. javanica* bekannt gewesenen Standort, einer von WRIGHT auf den Liu-kiu Inseln gesammelten Pflanze, deren Original mir im Kew Herbar vorlag. Es wird von FORBES und HEMSLEY in Enum. pl. Chinae 1889—1902, S. 198 aufgeführt. Die beiden zuletzt genannten Autoren geben als Verbreitung der *Veronica javanica*: North India from Simla to Khasia, and in Java.

Weiter nach Osten war die Pflanze bisher, wie eben gesagt nicht bekannt. Ehe wir die diesbezüglichen Daten eingehender prüfen, müssen wir indessen noch verschiedener westlich von den bisher besprochenen Gebieten bekanntgewordener Standorte gedenken.

In seiner Pflanzenwelt Ostafrikas (1895, S. 358) stellt ENGLER eine *V. chamaedryoides* auf, welche von VOLKENS häufig an Bachufern, in feuchten Gebüsch bei 1560 m. gefunden worden war. In Annals of Botany (1904, 18, S. 538) ändert er diesen Namen dann in *V. afrochamaedrys* um, da der Name *chamaedryoides* schon von BORY und CHAUBARD anderweit vergeben war. HEMSLEY und SKAN (in Thiselton-Dyer, Flora of tropical Africa, 1906, S. 357) erkannten aber, dass diese *V. afrochamaedrys* mit *V. javanica* Blume identisch ist und stellten sie folgerichtig zu dieser Art. VOLKENS und ENGLER fanden dieselbe dann noch an anderen Plätzen in Ostafrika, worauf weiter unten des näheren zurückzukommen sein wird. Ich konnte in Berlin die Identität dieser Pflanzen mit *V. javanica* nachprüfen.

Das Gebiet erweitert sich aber dann noch mehr durch eine von SCHWEINFURTH in *Erythraea* gesammelte und in dessen Herbar als *V. Erythraeae* bezeichnete Pflanze, die ich daselbst auch als *V. javanica* richtig stellen konnte, was unterdessen auch von HEMSLEY und SHAN erkannt worden war.

Als ich vor einigen Jahren einen Teil des Berliner *Veronica* Materials revidierte, fiel mir nun weiter die völlige Übereinstimmung der von MAXIMOWICZ (Diagn. plant. nov. asiat. IV Bull. de l'Acad. impér. des scienc. St. Pétersb. 27, 1881, S. 507) für Japan als *V. murorum* beschriebenen Pflanze, welche

ursprünglich aus Herbar ENGLER stammt, mit *V. javanica* auf. Das Material war indessen nicht sehr reichhaltig und ich wollte, ehe ich diese Beziehung als völlig gesichert hinstellen konnte, erst noch Material aus anderen Herbarien einsehen. Ich habe nun unterdessen *V. murorum* im Herb. Petersburg (Garten), Wien (Univ.), Kew, Leyden und Tokio nicht nur von dem von MAXIMOWICZ beschriebenen Originalstandort, sondern noch von verschiedenen anderen Plätzen aus Japan einsehen können, und es hat sich überall die gleiche Identität ergeben, sodass nunmehr kein Zweifel mehr obwalten kann, dass die echte *V. javanica* unter dem Namen *V. murorum* Maxim. in Japan vorkommt. Die einzelnen Standorte werden uns gleich noch beschäftigen. Es sei nur gleich hier noch erwähnt, dass die Lücke zwischen Japan und den Liu-kiu Inseln einerseits und dem Standort aus Tonkin andererseits durch das Vorkommen der *V. murorum* = *V. javanica* auf der Insel Formosa gefüllt wird. Wir werden auch die genauen Standorte auf Formosa gleich noch näher zu betrachten haben. Von dieser Insel wird *V. murorum* schon von MAXIMOWICZ (l. c.) und von MATSUMURA und HAYATA (Enum. pl. Formose, 1906, S. 282) angegeben.

Wir haben also nun eine ziemlich geschlossene Verbreitung unserer Pflanze durch die Subtropen und Tropen der Alten Welt vom äussersten Osten Asiens bis nach Erythraea kennen gelernt.

Damit ist die Verbreitung aber noch nicht erschöpft. Das Berliner Herbarmaterial enthält die folgenden 2 *Veronica*-Standorte aus Brasilien: *Veronica australi-americanum* 1882. *V. chamaedrys* var. *brazilensis* Üb. Petropolis Brazil Juli J. BALL.; E. ULE Herb. Bras. N. 3869 Am Aquaduct des Corcovado, Estado de Rio de Janeiro, März 1895. Beide ergeben bei genauerer Betrachtung, dass es sich nur um *V. javanica* Blume handeln kann. Dasselbe ist der Fall bei einem unbestimmten Exemplar, welches von J. F. WIDGREN in Brasilien gesammelt wurde und aus der Regnellischen Sammlung dem Herbar Upsala einverleibt wurde. Da weder Jahreszahl noch Standortsangabe

bei diesem Exemplar zu finden war, so ist es nicht möglich, eine sichere Angabe zu machen, wo die Pflanze herkommt. Es ist aber wohl sehr wahrscheinlich, dass auch diese Pflanze aus dem Staate Rio de Janeiro stammt. Denn nach Martius Flora Brasiliensis I, S. 143 hat WIDGREN zwischen 1841 und 1847 im Staate Rio de Janeiro und um Caldas im Staate Minas Geraes gesammelt.

Mehr kann ich auf Grund meiner Literatur- und Herbarstudien derzeit über die Allgemeinverbreitung der Pflanze nicht aussagen. Wir wissen aber nun, dass sich *Veronica javanica* Blume innerhalb der Wendekreise in der alten und neuen Welt vorfindet. In Asien, besonders in Japan überschreitet sie aber das Gebiet der tropischen Zone noch in etwas und dringt in die subtropischen Gebiete vor.

Es erhebt sich nun die uns besonders interessierende zweite Frage: Wie hat die Pflanze diese weite und ungewöhnliche Verbreitung erlangt und welcher Art sind die Standorte im speziellen, die innerhalb ihrer weiten Verbreitung von der Pflanze besiedelt wurden. Eine Antwort auf den zweiten Teil der Frage wird uns vielleicht auch über den ersten Teil derselben Klarheit verschaffen. Wir wenden uns also nunmehr dazu, die einzelnen von der Pflanze aus den verschiedenen Ländern mitgeteilten Standorte einer eingehenderen Prüfung zu unterziehen.

Es sind nach den einleitenden Bemerkungen besonders drei Gesichtspunkte, welche wir bei Betrachtung der Standorte zu berücksichtigen haben: Einmal wird auf die Höhenlage zu achten sein, 2. wird eine eventuelle Wasserpflanzennatur in Frage zu ziehen sein und endlich 3. wird es sich darum handeln, ob die Verbreitung der Pflanzen in Verbindung mit grossen Kulturzentren zu bringen ist.

Ich hatte schon erwähnt, dass BLUME die Pflanze vom Gipfel des Sederato und von den Katarakten des Flusses Tjikundul am Berge Gede beschreibt. Eine genauere Höhenlage dieser Standorte konnte ich nicht feststellen. Dieselbe erübrigt sich

aber durch die weiteren Standorte mit Höhenangabe, die mir von Java vorgelegen haben. Einmal sah ich in Kew aus dem Herbar Kuntze 2 Standorte. Der eine (5676) aus dem mittel-javanischen Gebirge Dieng bei 6000', der andere (4736), wie der 2. Blumesche am Berge Gede bei 8000'. Dazu kommt noch aus dem Herbar Leyden ein weiterer Standort aus dem Dieng Gebirge aus einer Höhe von 2000 Meter (Sammler Wiriosapoetro Nr. 58). Die Pflanze ist also in Java ein Bewohner der Gebirgsregion um 2000 m. Höhe. Andere javanische Standorte ohne nähere Angaben, die ich in verschiedenen Herbaren einsah, sind die folgenden: 149, Java, Dr. PLOEM; 1912 *Planta javanica*. ZOLLINGER lecta (vgl. MORITZI, Verz. d. v. ZOLLINGER 1842—44 auf Java gesammelten Pflanzen S. 48). 2165 *Wichura Java* Kendang Badak. 61. 21/12. det. Vatke; 48 Mount Gedeh 1. March 97 H. W. L. COUPERUS (Herb. Univ. Kristiania) T. HORSFIELD Java (Kew).

Ich kann über all diese Standorte nichts näheres angeben. Doch teilte mir Herr Professor VOLKENS mit, dass er am Gedeh und Pangerango in der in Frage kommenden Höhenlage ganz gleiche Vegetationsverhältnisse, ja eine ausserordentliche physiognomische Ähnlichkeit gefunden habe, wie am Kilimandscharo in derselben Höhe wo unsere Pflanze ja auch dort vorkommt. Wir werden also nicht fehl gehen, wenn wir die gleich näher zu besprechenden Vegetationsverhältnisse, über welche ich auch Herrn Professor VOLKENS nähere Auskunft verdanke, auch in den javanischen Verbreitungsbereich der Art annehmen.

Eingehender konnte ich mich bezüglich der indischen Standorte orientieren. Ich bin Herrn Dr. STAPP zu vorzüglichem Danke verpflichtet, welcher mich während meines Aufenthaltes in Kew in dieser Hinsicht weitgehendst unterstützte.

In *Flora of british India* (1885, 4, S. 296) sagt HOOKER für *V. javanica*: Subtropical and temperate Himalaya from Simla to Bhotan, alt. 3—7000 ft. Khasia alt. 5—6000 ft. Mit diesen Angaben decken sich meine allgemeinen Herbarbefunde. Die Pflanze liegt also von Standorten aus ziemlich der ganzen Ausdehnung des Himalaya vor. Aus niedrigeren Gegenden

Indiens findet sich keine Angabe, auch nicht aus den südlicheren indischen Gebirgen. Wir werden indessen sehen, dass die Pflanze auch in rein tropisches Klima hineinreicht.

Was nun an der weiten Verbreitung durch den Himalaya ganz besonders auffällt, das ist die Tatsache, dass alle Verbreitungsregionen in der Umgegend grösserer Kulturzentren zu liegen kommen. Da ist einmal zu nennen Simla Hills (7000 ft. HOOKER); es folgen weiter eine Reihe von Standorten von Shillong in den Khasi hills. Es sind die Hookerschen Standorte: Nurtiung, Myrong, Nonkrem und ein anderer nicht genau leslicher, im Original auf einem Bogen des Kew Herbars zusammen. Dann liefert Sikkim zahlreiche Standorte, einmal Phedong (3000 ft. CLARKE). Dieser Standort liegt im Terai von Sikkim mit noch rein tropischem Klima, wohin die Pflanze wohl sicher durch die reisenden Gebirgsbäche gebracht wurde, an deren Ufern wir sie noch mehrfach antreffen werden. Ebenfalls im Terai liegt dann der Standort von Callegury. Auch von Darjeeling in Sikkim liegen Standorte (GRIFFITH) vor; in Berlin einer: 272 Rangit Valley 1862 Anderson; sodann aus eben dieser Gegend in Kew: Simonbong, einer Tempelstation in Sikkim. Weiter folgt eine Reihe von Standorten aus dem ebenfalls hochkultivierten Kumaon: Almora (Major Madden, 5500 ft.); Nainithal (632 Apr. 1844 THOMSON) — der See des Tales liegt bei 6350 Fuss, die Höhen, von welchen die Pflanzen stammen dürften, erheben sich darum herum bis zu 8000 ft. Sodann Hawalbagh wo sich ein Truppenkantonement befindet; der Platz liegt 5 Meilen nördlich von Almora bei 3889 ft. Endlich Dibroghur in Assam bei 3770' (CLARKE) und Bhotan (GRIFFITH) 2435'.

Das Ergebnis unserer Zusammenstellung der Standorte, im Himalaya, über welche näheres zu eruieren war, ist also das, dass *V. javanica* im Himalaya zwischen 3 und 8000 Fuss Höhe aus 3—4 hochkultivierten Gegenden, ziemlich lokalisiert bekannt ist. Wir können nicht umhin, hier an eine Verbreitung durch den Menschen zu denken. Denn sonst wäre ein so vertheiltes Vorkommen doch kaum zu erklären.

Über den Standort aus Tonkin weiss ich, wie schon gesagt, nichts näheres anzugeben; doch ist auch diese Landschaft mit Hanoi und seiner grossen Ausstellung vor nicht langer Zeit so hochkultiviert, dass wir den Menschen als Verbreiter leicht in Frage ziehen können. Jedenfalls können wir das Vorkommen in Tonkin am belebten Black river, so weitgetrennt von den übrigen Standorten nicht besser erklären.

Weiter führt uns die Verbreitung dann nach Formosa. Das Verbreitungsbild auf Formosa spricht aber nun wieder ganz für menschliche Vermittelung. Hier liegen die folgenden Standorte vor: Taihoku; Taipeh in herbidis Nr. 265 30. Apr. 1903 leg. Faurie; Tansuy, Rich. Oldham 1864, 407 *V. lava?* Benth. Nr. 161. Der Freihandelshafen Tansuy mit seiner Eisenbahn und Flussverbindung nach den reich bevölkerten Städten Taipeh und Taihoku, dazu die Angabe in herbidis, das alles lässt uns ohne weiteres auf menschliche Verbreitung schliessen. Über die Höhenverbreitung kann ich hier keine Angaben machen, doch scheint die Pflanze hier etwas weiter herabzusteigen.

Die Verbindung mit Japan stellt nun der Standort auf den Liu-kiu Inseln her. Diese Pflanze war, wie oben erwähnt, schon von FORBES und HEMSLEY als *javanica* erkannt worden, während alle Pflanzen von Formosa und Japan als *murorum* gingen. Etwas näheres konnte ich auch in Kew über den Standort auf den Liu-kiu Inseln nicht ermitteln.

Die Standorte, die ich von Japan sah, stammen nun auch wieder sämtlich aus der Umgegend grosser Plätze. Besonders in Frage kommen die beiden südlichsten Inseln Kiuschiu und Schikoku. Am häufigsten ist die Pflanze aus der Umgegend von Nagasaki genannt. Hier fand sie zuerst MAXIMOWICZ und von da beschrieb er sie in Diagn. plant. nov. asiat. IV. Bull. Akad. imp. Sc. St. Petersb. 27 (1881) S. 507 als *V. murorum*. Er gibt sie einmal an: circa urbem Nagasaki, in muris vetustis rara (ipse) und dann, von dem nördlichsten Standort der Pflanze, den ich derzeit aus Japan kenne in montibus Hakone (SIEBOLD). Auf Kiuschiu liegt dann auch Kagoschima, von wo ich sie in Herb. ENGLER fand. Hinzu kommen aus demselben

Herbar Satsuma und Tachiro. Von Schikoku lag mir ein Standort von Kochi in der Provinz Tosa vor. All diese Angaben von Aeckern, Mauern und aus hochkultivierten Gegenden, zu meist in der Nähe grosser Handelsplätze lassen mit Sicherheit auf eine kulturbegleitende Pflanze schliessen. Höhenangaben liegen keine vor; nur das in montibus Hakone lässt auf eine montane Verbreitung schliessen, wenn auch das ganz Verbreitungsbild etwas mehr nach den tieferen Regionen sich zu erstrecken scheint.

Wenden wir uns nun zum afrikanischen Verbreitungsgebiet. Die voll ausgeschriebenen Standorte sind die folgenden: G. VOLKENS, Reise nach dem Kilimandscharo. Nr. 760. An Bachufern, in feuchtem Gebüsch, häufig. Landschaft Marangu 1550 m. 19.8.93; Nr. 585 1560 m. an einem Wasserlaufe häufig 11.7.93.; Gallaland: in Coromma ad. fl. Uovemme 7.9.93. Riva Nr. 613; Nr. 290 Umbugwe und Iraku Rand des ostafrik. Grabens leg. Hptm. Merker 1902—03; Nr. 1049 A. ENGLER, Reise nach S. und O. Afrika 1902 West-Usambara: Adlerfarnformation zwischen Sakari und Mauka 1400—1500 m.

Über die Art des Vorkommens unserer Pflanze in diesem Gebiete verdanke ich nun der Freundlichkeit des Herrn Professor VOLKENS einige nähere Angaben, aus denen ich hier das wichtigste mitteilen möchte: Die *Veronica javanica* habe ich allerdings nur im Kulturgürtel gesehen; dass sie eingeschleppt wäre, möchte ich aber für ausgeschlossen halten. Sie kommt wenigstens nicht auf Neuland vor, wie die sicher eingeschleppten Pflanzen, sondern in den Wiesenstreifen, die sich zwischen 1200 und ca. 2000 m. überall da längs der Bäche und künstlichen Wasserläufe hinziehen, wo der Boden eben oder nur schwach geneigt ist. Diese Streifen haben dauernd eine ganz geschlossene Vegetationsdecke aus niederen Gräsern und Kräutern. Letztere gehören freilich in der Mehrzahl europäischen Gattungen an (*Trifolium*, *Cardamine*, *Epilobium* etc.), sind aber fast ausschliesslich afrikanische Arten. In den Wiesenstreifen giebt es eigentlich nur eine einzige Pflanze, die den von Europa kommenden Laien fremdartig anmutet, *Gunnera perpensa*. Mir

ist es, heisst es dann weiter, übrigens 1902 am Gedeh und Pangerango Vulkan in Java aufgefallen, dass dort in gleicher Höhe dieselben Typen auftraten, wie am Kilimandscharo. Im Kilimandscharowalde, der bei 1800—2000 m. anfängt, erinnere ich mich nicht, *V. javanica* gesehen zu haben, halte es aber sehr wohl für möglich, sogar wahrscheinlich, dass sie da auf den Geröllinseln der Bäche auch vorkommt. Eine dauernde Durchtränkung des Bodens, wie sie die zahllosen Bäche und künstlichen Wasserleitungen des Kulturlandes garantieren, scheint für die Pflanze Bedingung des Gedeihens zu sein.

Auffallend dürfte es nach diesen Angaben immerhin bleiben, dass auch von hier die Pflanze aus der Kulturzone allein bekannt ist. Immerhin scheint ja hier und in Java noch am ersten die Pflanze im ursprünglichen Zustande angetroffen zu werden, wenschon sie eben auch hier zur Kulturbegleiterin geworden ist.

Ganz besonders schön ersehen wir aber aus diesen Angaben von VOLKENS, welche in vorzüglicher Übereinstimmung mit den übrigen diesbezüglichen gelegentlichen Bemerkungen von überallher übereinstimmen, dass die Pflanze an reichliche Bewässerung gebunden ist. Allerorten lernten wir sie von Flussufern, Katarakten, Gebirgsbächen etc. kennen. Die Pflanze scheint also besonders an feuchte Unterlage gebundene Kulturen der montanen Tropenzone zu begleiten.

Wir haben damit alles erledigt, was mir über die Verbreitung der Pflanze aus Asien und Afrika vorlag. Wir werden nun mit besonderen Interesse zu erwarten haben, ob die Pflanze nicht auch noch aus anderen Ländern der asiatischen tropischen Gebirgsländer bekannt wird; z. B. legt die Verbreitung in den Khasi Hills ein Vorkommen in Siam nahe.

Wie verhält es sich aber nun mit den brasilianischen Standorten? Bei genauerem Zusehen machen ganz besonders diese Standorte eine Verbreitung durch den Menschen wahrscheinlich. J. BALL, der die Pflanze bei Petropolis sammelte, scheint sich während seines dortigen Aufenthaltes nicht allzuweit von dem Orte entfernt zu haben (vgl. BALL, Notes of a Naturalist in South

America, London, 1887, S. 328); der Corcovado aber, wo Ule die Pflanze sammelte, wie Petropolis sind beides so besuchte Touristenorte, dass sich eine Verschleppung dahin leicht erklären liesse. Bemerkenswert aber ist auch wieder das Vorkommen im Gebirge. Corcovado liegt bei ca 2200', Petropolis aber bei 2900'. Über den WIDGRENSCHEN Standort wissen wir nichts genaueres.

So haben wir unseren Ehrenspreis also in seiner Verbreitung durch die Bergländer der Tropen und Subtropen verfolgt und feststellen können, dass er die weiten Gebiete sicher nicht selbstständig erobert hat. Bei ihm spielt einmal die Verbreitung durch den Menschen und dann der Umstand, dass er die Ufer von Wasserläufen besiedelt, eine sehr wichtige Rolle. Die alte Anschauung, dass Bürger der Tropen ohne diese Faktoren eine weite Verbreitung innerhalb der Wendekreise nicht erlangen, kann durch diesen Fall universellen Vorkommen nicht durchbrochen werden, findet im Gegenteil in ihm eine starke Stütze. Wir möchten die Pflanze als einen Begleiter tropischer und subtropischer, an reichliche Bewässerung gebundener Bergkultur bezeichnen. Der Fall zeigt aber, wie eine Nachprüfung weitverbreiteter Pflanzen oft zu recht unerwarteten Ergebnissen führt. Denn von *Veronica javanica* hatte man solches bisher wohl kaum vermutet. Vielmehr waren die Auffassungen über die Natur dieser Pflanze teilweise bislang recht andersartige. Ich möchte im Anschluss an die besprochenen Verhältnisse einer Anschauung gedenken, die ENGLER sich über diese unsere Pflanze, soweit sie das afrikanische Gebiet besiedelt, gemacht hat, die aber durch unsere Darlegungen wohl sicher unhaltbar geworden ist.

ENGLER beschreibt in dem schon genannten Aufsätze (Annals of Bot., 1904, 18, S. 538) Pflanzen der nördlichen gemässigten Zone, welche in die Hochgebirge des tropischen Afrikas übergegangen sind und sich dort zu Gebirgspflanzen mit abweichendem Charakter verwandelt haben. Zu diesen Pflanzen soll auch die von ENGLER

V. afrochamaedrys genannte *V. javanica* gehören, welche auf *V. Chamaedrys*, als ihrer Ursprungspflanze, zurückgeführt wird. Ich beabsichtige nicht an dieser Stelle der systematischen Stellung unserer Art eine eingehende Besprechung zu widmen. Es würde dafür nötig sein, dass ich alle altweltlichen *Veronica*-Gruppen eingehend durchgearbeitet hätte, was aber bisher noch nicht der Fall ist. Denn ich halte es absolut nicht für ausgemacht, dass *V. javanica* in die Sektion *Chamaedrys* gehört. MAXIMOWICZ bringt z. B. seine *V. murorum* in die Sektion *Beccabunga*. Die nunmehr bekannt gewordenen Verbreitungsverhältnisse passen aber so ganz und gar nicht zu der Englerschen Auffassung.

In den meisten Ländern, aus denen *V. javanica* bekannt ist, fehlt *V. chamaedrys* vollkommen. Wie wollen wir uns das Auftreten in Java, einem höchst wahrscheinlich ursprünglichen Standorte mit *V. Chamaedrys* in Übereinstimmung gebracht denken? Zudem sind Kapselgestalt, Griffellänge und andere für die *Veronicae* überaus wichtige trennende Merkmale bei *V. javanica* von *V. Chamaedrys* so erheblich verschieden, dass die Annahme einer solchen Abstammung recht gewagt erscheint. Wir werden also zweifellos *V. javanica* Bl. oder *V. afrochamaedrys*, wie sie dort genannt wird, nicht mehr unter die Stützen der von ENGLER in genanntem Aufsatz vorgebrachten Anschauung rechnen dürfen.

Immerhin bleibt die Eigenartigkeit des Vorkommens der *V. javanica* besonders auf Java noch von hohem Interesse und wir fragen uns bisher vergebens, warum gerade diese Art als einzige *Veronica* die malayischen Gebirgsbäche besiedelt hat. Man sollte nicht versäumen der interessanten Verbreitung dieser Art ein erhöhtes Interesse zuzuwenden und besonders auf ihren Zusammenhang mit der tropischen Bergkultur achten. Gerade der Gedeh in der Nähe des vielbesuchten Tjibodas böte hierzu gute Gelegenheit.

Tübingen, November 1911.

UEBER DIE VEGETATIVE VERMEHRUNG VON ANGIOPTERIS ERECTA HOFFM.

VON

W. DOCTERS VAN LEEUWEN.

Samarang—Java.

EINLEITUNG.

Während eines Spazierganges im Botanischen Garten zu Buitenzorg zeigte Herr Dr. J. J. SMITH mir die eigentümliche Weise, wie die abgefallenen Blatteile von *Angiopteris* Adventivknospen bilden. Als ich später dieselben Pflanzen im Urwalde reichlich fand, sah ich, dass diese Vermehrungsweise auch hier Regel war. Im Urwalde des Oengaran-Gebirges waren die *Angiopteris*-pflanzen sehr häufig, auch bei Trètès und Prigen auf dem Ardjoeno-Gebirge habe ich das Knospenbilden der abgefallenen Blatteile wahrgenommen, und ausserdem in den Klüften des Telamaja-, Menjir- und Gilipitoeng-Gebirges.

RACIBORSKI¹⁾ hat in einer kurzen Notiz auf dieselbe Eigentümlichkeit dieser Farnen die Aufmerksamkeit gelenkt. Da es mir möglich war reichliches Material zu sammeln, kan ich der Notiz von RACIBORSKI noch einige Tatsachen hinzufügen.

Bekanntlich gehört *Angiopteris* zu den häufigeren Erscheinungen des Urwaldes. Mit den *Alsophila*-Arten gehören sie zu den Riesenfarnen. Aber während letztere auch an offenen Waldstellen vorzüglich gedeihen können, ist *Angiopteris* eine Pflanze, die am üppigsten im tiefsten Schatten des Urwaldes wächst.

1) M. RACIBORSKI. Ueber die vegetative Vermehrung der Marattiacee *Angiopteris erecta*. Bull. de l'Acad. d. sc. de Cracovie; Classe d. sc. math. et naturelles. Janvier 1902, S. 48.

Gewöhnlich findet man sie in tiefen, feuchten Schluchten des Gebirges und vorwiegend in der Nähe von Bächen oder kleinen Flüssen. Meistens kommen sie auf einer Höhe von 700—1800 m. vor.

Der fast kuglige Stamm kann bis zu 70 cm. hoch werden, gewöhnlich aber ist er etwas niedriger. Äusserlich ist vom Rhizom selbst nichts zu sehen, da es gänzlich von den basalen Blatteilen bedeckt ist. An der Spitze trägt das Rhizom die 6—10 riesengrossen gefiederten Blätter, welche bisweilen 4 m. lang werden können. Diese Blätter bestehen aus einem etwa armdicken Blattstiel und aus der 2- bis 3-fach gefiederten Blattspreite. Der Blattstiel selbst besteht auch wieder aus zwei Teilen. Der grössere Teil ist stielrund und ungefähr 5 cm. dick, aber die Basis des Blattstieles ist über eine Länge von ungefähr 20 cm stark angeschwollen und an beiden Seiten ist ein zum Teile fleischiges Nebenblatt befestigt. Auch RACIBORSKI hat schon wahrgenommen, dass beide Blatteile eine ungleiche Lebensdauer haben. Blattstiel und Blattspreite leben gewöhnlich nicht länger als 2—3 Jahre, danach verwelken sie und fallen sämtlich ab, nachdem sich zwischen Blattstiel und Blattstielbasis eine verkorkte Trennungsschicht gebildet hat. Die Blattstielbasis samt den beiden Nebenblättern bleiben aber noch Jahre lang mit dem Rhizom verbunden, endlich fallen auch sie ab. Wie lange sie mit der Pflanze verbunden bleiben ist mir nicht bekannt, aber erst bei sehr grossen Pflanzen kann man die abgefallenen Stücke unter der Pflanze finden. Diese abgefallenen Teile sind schwarz oder braun gefärbt und meistens von einer Humusschicht überdeckt. Was die Form anbetrifft kann man sie am besten mit Pferdehufen vergleichen. Mehrmals bilden sie grosse Ansammlungen unter der Mutterpflanze, wobei sie von verfaulten Blättern ganz überdeckt sein können. Sie können aber auch vom Regenwasser losgerissen und nach dem Tale mitgeführt werden. Da diese abgefallenen Stücke leicht Knospen bilden, befinden sich oft viele jungen Pflanzen unter der Mutterpflanze.

Die Verbreitung dieser interessanten Farnen wird auf diese Weise sehr gefördert. Es ist aber selbstredend, dass dies nicht die einzige Entwicklungsmodus dieser Pflanzenart sein kann,

sonst würden sich die neuen Pflanzen immer mehr in der Richtung der Ebene entwickeln, wo sie schliesslich nicht mehr wachsen könnten. Auch auf geschlechtliche Weise kann *Angiopteris* sich vermehren. Die Prothallien sind denn auch schon längst bekannt 1).

UEBER DIE BILDUNG DER ADVENTIVKNOSPEN.

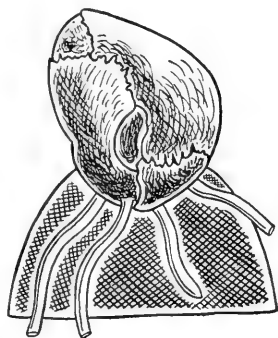
Die dicken Blattbasen von *Angiopteris* sollen nach RACIBORSKI 2) als Wasserreservoir fungieren, wie er solche als Wasserbehälter dienenden Blattbasen auch bei einigen anderen tropischen Farnen, wie *Lastraea*, *Boryna* und *Plagiogyria*-Arten beobachtet haben will. Das Gewebe der Blattbasis von *Angiopteris* besteht fast ausschliesslich aus isodiametrischen Parenchymzellen, weiter aus den zahlreichen Tracheiden enthaltenden Wasserleitungsbahnen und schliesslich aus den eigentümlichen Schleimgängen, welche nach RACIBORSKI 2) den Milchröhren ganz homologe Gebilde sind. Die äusseren Zellen sind etwas kleiner als die mehr im Innern liegenden und die Epidermiszellen bilden eine korkähnliche Schicht, d. h. die Zellenwände sind mit Korkstoff durchtränkt, und braun gefärbt. Diese äusseren Zellschichten können aber bald verfaulen und humifiziert werden. Die grossen Parenchymzellen sind ganz von Amylumkörnern ausgefüllt. Diese Stärkekörner sind zylindrisch und an beiden Enden abgerundet (Figur 3). Ein grosser Teil der von den Blättern gebildeten Stärke wird denn auch in der Blattstielbasis aufgespeichert, sodass diese Basen sicherlich als Nahrungsreservoir fungieren. Ich glaube denn auch, dass ihre Bedeutung für das Leben der Pflanze mehr in dieser Richtung gesucht werden muss. Während die beiden Nebenblätter kurz nachdem das Oberblatt abgefallen ist, noch leicht zu finden sind, werden sie allmählig undeutlicher, sie verschwinden aber nicht. Ihre Zellen werden aber voluminöser, wodurch sie nach einiger Zeit fast gleichmässig in die Blattbasis übergehen; und ausserdem verfaulen die scharfen Kanten. In diesem Zustand bleiben die Blattstielbasen sammt ihren Nebenblättern Jahre lang mit der Pflanze verbunden. Warum sie schliesslich abfallen ist

1) FARMER. The Embryogeny of *Angiopteris evecta* Hoffm., Annals of Botany, V. 1892.

2) Loc. cit., Seite 49.

mir nicht bekannt. Da ihr spezifisches Gewicht ungefähr eins beträgt, werden sie leicht vom Wasser mitgeführt, wie ich an Ort und Stellen denn auch konstatieren konnte. Diese ruhenden Basen bilden nun an ihren Flanken die Adventivknospen. Es war nun die Frage, wo sie dieselben bildeten. Anfangs glaubt man, dass sie an jeder beliebigen Stelle entstehen können; nähere Untersuchung zeigt aber bald, dass die Sache nicht so einfach ist. Die Stelle, wo eine Adventivknospe sich entwickelt ist schon lange vorher angegeben oder vielmehr, die Knospen selbst sind schon längst gebildet, ehe, die Blattstielbasis sich von der Mutterpflanze getrennt hat. Sie bleiben nur ruhen, bis sie zur weiteren Entwicklung gereizt werden.

Nach VELENOVSKY¹⁾ sind Adventivknospen „Knospen, welche ausserhalb der Achsel an welcher Stelle der Pflanze immer zum Vorschein gelangen“. In diesem Sinne sind auch bei *Angiopteris* die an der Blattstielbasis entstehenden Knospen nichts anders als Adventivknospen. In den meisten Fällen entstehen diese Adventivknospen aber, wenn der betreffende Pflanzenteil abgefallen oder wenigstens erwachsen ist. Dies ist bei *Angiopteris* gar nicht der Fall. Untersucht man die abgefallenen Blatt-



Textfigur I.

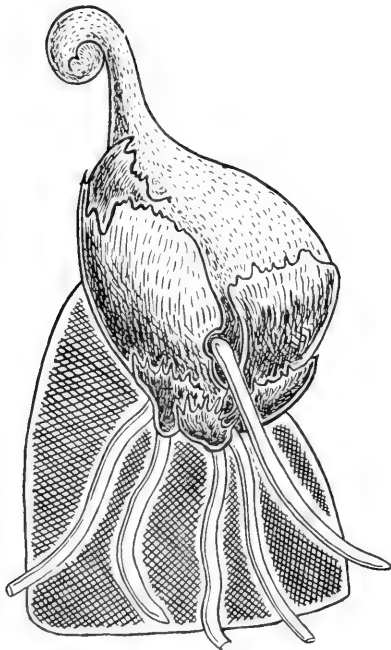
Junge Knospe auf einer Blattstielbasis von *Angiopteris*. Nat. Grösse.

basen welche schon Knospen gebildet haben, dann sieht man, dass sie immer an bestimmten Stellen entstehen, und zwar an den Ecken, wo die Ränder der Nebenblätter in die Blattbasis übergehen. Da dieses an zwei Stellen der Fall ist, und jede Basis zwei Nebenblätter trägt, muss jede Basis also vier solche Stellen besitzen, wie denn auch tatsächlich der Fall ist. In Figur 4 ist eine Basis einer ganz jungen Pflanze abgebildet und sind die genannten Ecken durch die Buchstaben a und b angegeben. Aber nur selten bilden die Basen alle sämtliche vier Knospen aus, wie das zum Beispiel bei dem in Figur 1 abgebildeten Object der Fall war. Gewöhn-

1) VELENOVSKY. Vergleichende Morphologie der Pflanzen. Teil II. Seite 696.

lich entwickelt sich nur eine Knospe und im Walde meistens die an der mit a bezeichneten Stelle. Schneidet man aber ein noch kräftig lebendes Blatt einer noch jungen Pflanze ab und kultiviert man dieses z. B. in feuchtem *Sphagnum*, so wachsen die Knospen an den mit b bezeichneten Stellen aus, wie das in Figur 2 und 5 zu sehen ist.

Um darüber Gewissheit zu erlangen, wurden mit einem scharfen Messer Querschnitte von noch nicht zu grossen Blattbasen gemacht und dann zeigte sich, dass, wenn der Schnitt die Stellen a oder b getroffen hatte, unterhalb derselben eine grüne Stelle zum Vorschein kam. Dieser grüne Flecken war nichts anders als eine junge ruhende Knospe. Diese besteht aus kleinen chlorophyllhaltigen Zellen, die nach innen mit einem Gefässbündel in Verbindung stehen.



Textfigur II.

Etwas älteres Stadium, als in Figur I
abgebildet ist. Nat. Grösse.

Ausserdem kann man noch eine Vegetationsspitze daran erkennen mit den Anlagen der ersten Blattschuppen (Figur 8). Ist das Blatt aber jünger, d. h. eben entfaltet, so ist die Vegetationsspitze mit den Anlagen der Blattschuppen auch schon zu sehen (Figur 7). Ist das Blatt aber sehr jung d. h. nicht einmal ausgerollt, so ist die Knospe noch nicht ganz ausgebildet. Man findet an der Stelle b nur einen untiefen und engen Kanal, der an seinem Ende etwas erweitert ist. Der Boden dieser Erweiterung ist etwas aufge-

getrieben und bildet die Anlage der Vegetationsspitze (Figur 6). Schon im diesem Stadium ist das kleinzellige, chlorophyllhaltige Gewebe entwickelt und ausserdem ist die Verbindung mit einem Gefässbündel schon erkennbar.

Der Stengelteil einer ganz jungen Knospe ist also aus Zellen der Blattbasis entstanden, während die Anlagen der Blattschuppen und der jungen Blätter von der Vegetationsspitze gebildet werden. In diesem Zustand verharret die Knospe meistens viele Jahre lang. Von aussen ist von diesen Knospen nichts zu sehen, auf Querschnitte kann man sie, aber an den grünen Flecken leicht erkennen.

Bald nachdem die Blattbasis von der Pflanze abgefallen sind, beginnt eine oder mehrere Knospen sich zu entwickeln. Äusserlich erkennt man die ersten Entwicklungsstadien daran, dass die jungen wachsenden Knospenteile das Gewebe der Basis nach oben und nach aussen drücken (Figur 10), und bald nachher sieht man die braunen Blattschuppen, die nichts anders sind als eine Blattbasis mit den zwei Nebenblättern, zum Vorschein kommen. Aber auch im Innern entstehen mehrere Veränderungen, indem die ersten Wurzelanlagen gebildet werden. Das kleinzellige Gewebe vergrössert sich und nach allen Seiten entstehen kleine runde Höcker, die alsbald länger und länger werden (Figur 9). Diese zarten kein Chlorophyll enthaltenden Wurzelanlagen wachsen nach aussen durch das Gewebe der Blattbasis hindurch. Im Innern der jungen Wurzeln entstehen dann die Tracheiden, welche mit denen des Knospenstammes in Verbindung stehen (Figur 10). Während die Blattanlagen immer zahlreicher werden und das Rhizom schon um ein wenig über die alte Blattstielbasis hervorragt, brechen auch die ersten Wurzeln aus der Oberfläche der Blattbasis und wachsen eng an der Oberfläche liegend weiter. Ist die Knospe schon etwas älter geworden so entwickeln sich die neuen Wurzeln über der alten Blattstielbasis, auch diese Wurzeln wachsen Anfangs an ihrer Oberfläche anliegend weiter (Figur 1) und erst später suchen die Wurzeln sich einen Weg in die Humusmassen der Umgebung. Noch lange nachdem die junge Pflanze schon Blätter gebildet hat, bleibt die mit der alten Blattstielbasis verbunden, und erst allmählig verfault letztere.

Die schon deutlich sichtbaren Knospen sind eiförmig (Textfigur 1). Sie bestehen aus einem kurzen Rhizom, das mittels

eines Stielchens (der Stengelteil der ruhenden Knospe) mit der alten Blattstielbasis in Verbindung steht. Das Rhizom ist ganz von den grossen braunen Schuppen bedeckt. Diese werden allmählich grösser und liegen sehr eng an einander, sodass man sie nur mit Gewalt aus einander biegen kann. Erst wenn die Knospe schon ziemlich gross geworden ist, entwickelt sich das erste Blatt (Textfigur II). Während also die ersten Blattanlagen nur aus Blattbasis und den beiden Nebenblättern bestehen, entsteht zuletzt ein ganz entwickeltes Blatt. In den beiden Textfiguren ist eine jüngere und eine ältere Knospe abgebildet. Die Entwicklung der Knospen geht ziemlich langsam vor sich. Eine grosse Blattstielbasis, welche ich Anfang Juni in feuchtes *Sphagnum* setzte und die eine Knospe von einigen mm Grösse besass, zeigt jetzt, sechs Monate später, eine Knospe von ungefähr 15 mm. Sind die ersten Blätter aber zum Vorschein gekommen, so folgen die anderen etwas schneller; das Wachstum dieser kleinen Pflanzen ist aber nicht besonders schnell.

RESULTATE.

1. Jede Blattstielbasis von *Angiopteris* besitzt, wenn das Blatt noch mit der Pflanze verbunden ist, vier ruhende Knospen, welche an den Stellen sitzen, wo die Ränder der Nebenblätter in die Oberfläche der Blattbasis übergehen.

2. Wenn das Blatt alt wird, so fällt das Oberblatt, d.h. Blattstiel und Blattspreite ab und die Blattstielbasis mit den beiden Nebenblättern bleibt noch viele Jahre mit der Pflanze verbunden.

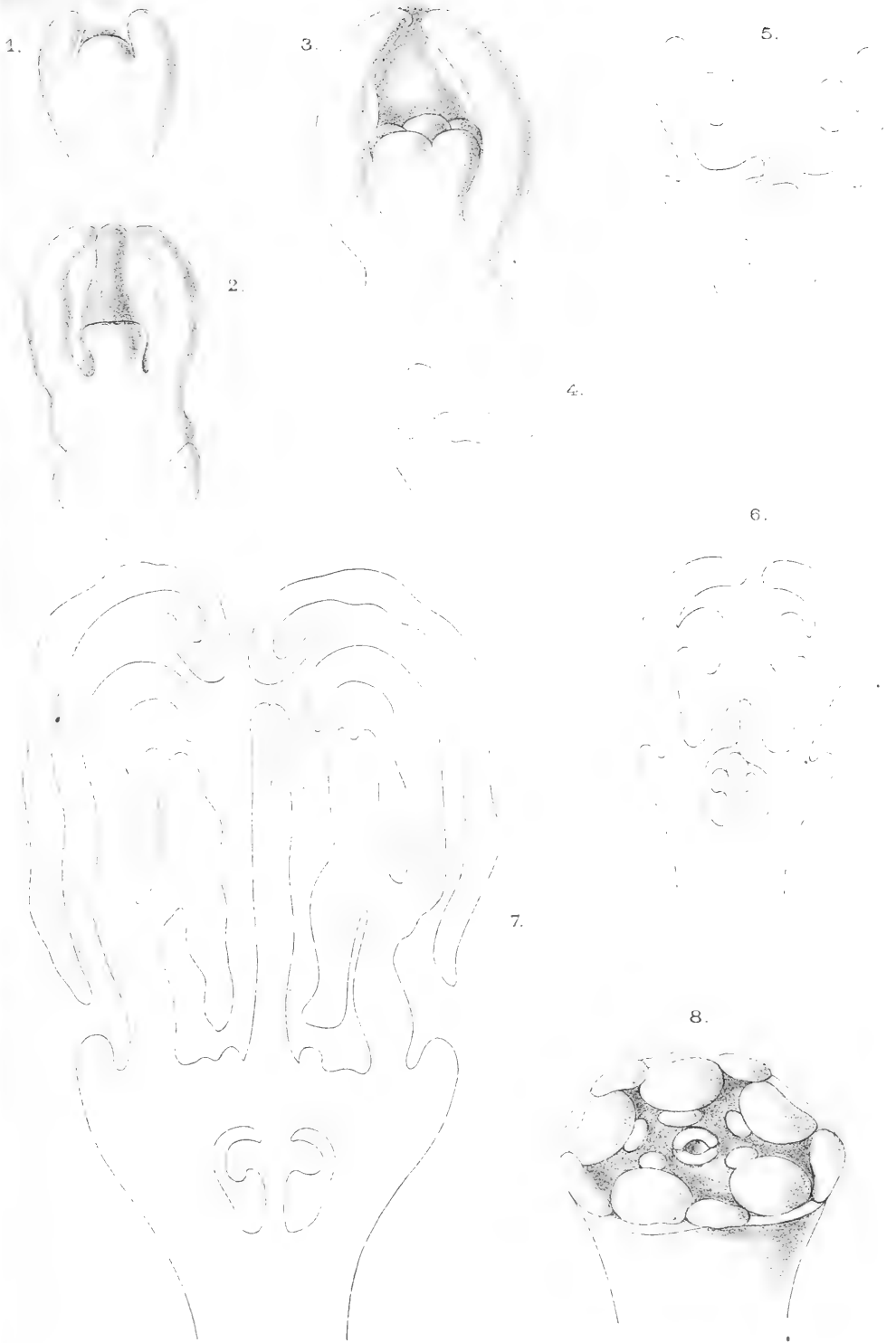
3. Nach einigen Jahren fällt die Blattbasis ab und eine oder mehrere Knospen fangen an sich zu entwickeln.

ERKLÄRUNG DER FIGUREN.

TAFEL XVIII.

- Fig. 1.** Eine abgefallene und Knospenbildende Blattstielbasis von *Angiopteris evecta*. $\times \frac{1}{2}$. Trètès auf dem Ardjoeno, Mai, 1914.
- Fig. 2.** Abgeschnittene und danach Knospenbildende Blattstielbasis von einer sehr jungen *Angiopteris*-Pflanze, von der Seite gesehen. $\times 1$.
- Fig. 3.** Parenchymzellen mit Amylumkörnern aus einer erwachsenen Blattstielbasis. $\times 150$.
- Fig. 4.** Blattstielbasis und Nebenblatt einer sehr jungen *Angiopteris*-Pflanze, $\times 1$; a und b Stellen wo die ruhenden Knospen sitzen.
- Fig. 5.** Wie Figur 2, aber von der abgeschnittenen Stelle gesehen, $\times 1$.
- Fig. 6.** Anlage der Knospe bei einem noch nicht entwickelten Blatte.
- Fig. 7.** Anlage einer Knospe bei einem entfalteten Blatte.
- Fig. 8.** Etwas älteres Stadium. Vegetationspunkt mit Scheitelzelle (nur schematisch angegeben) schon deutlich entwickelt.
- Fig. 9.** Junge, sich aber schon entwickelnde Knospe an einer abgefallenen Blattstielbasis.
- Fig. 10.** Etwas älteres Stadium mit mehr entwickelten Wurzeln.
-





v. Faber del.

Fa. P. W. M. Trap impr.



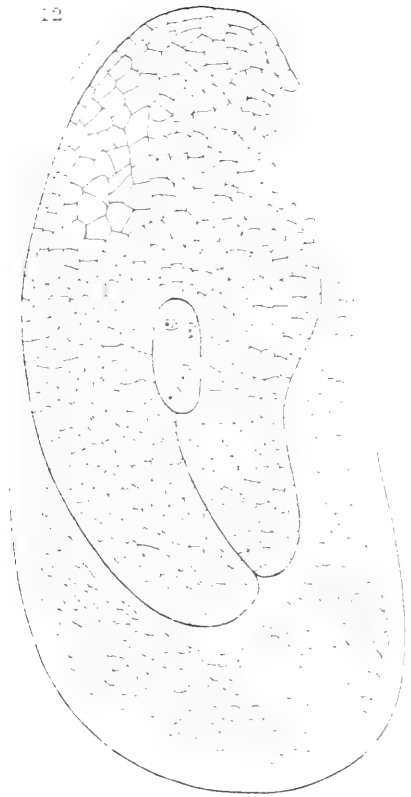
9.



10.



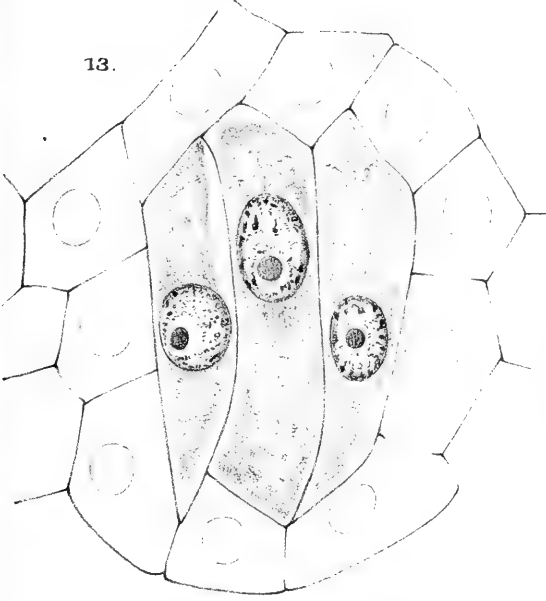
12.



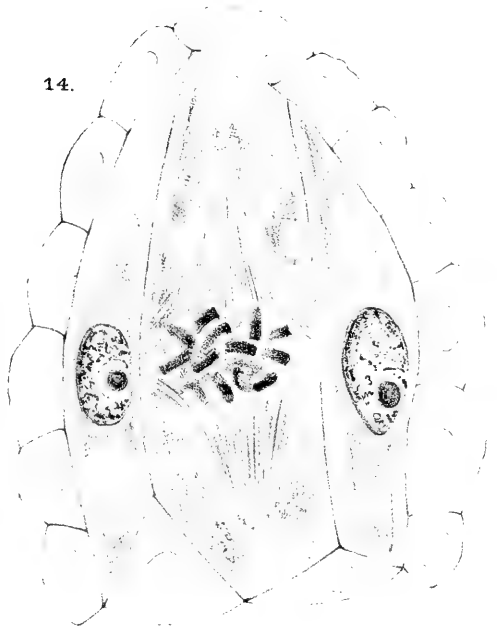
11.



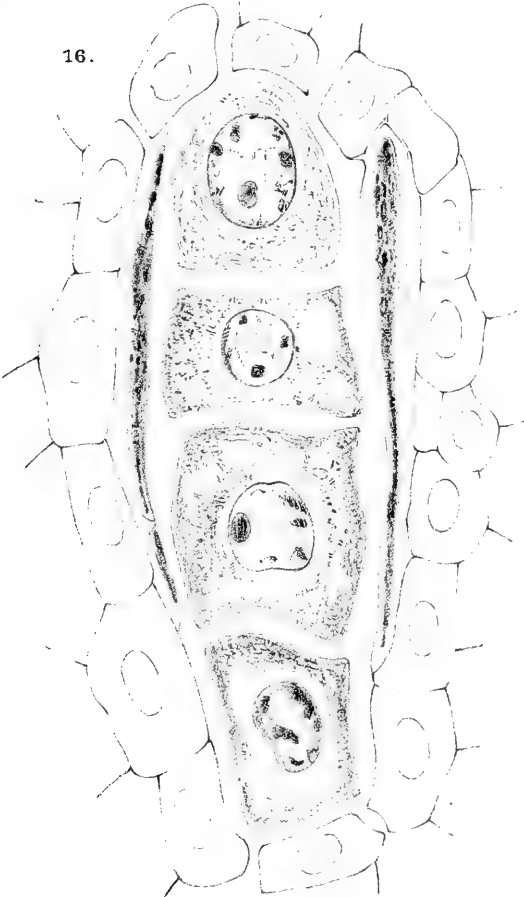
13.



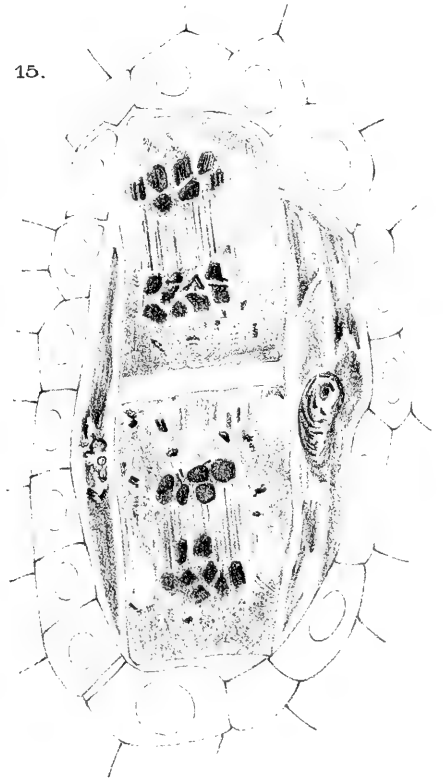
14.



16.



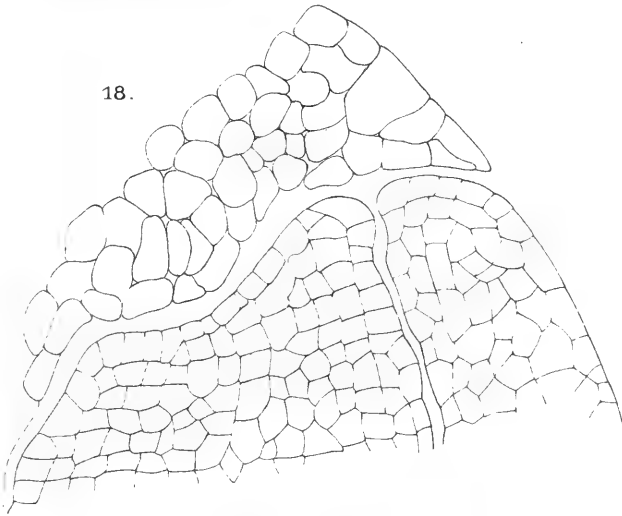
15.



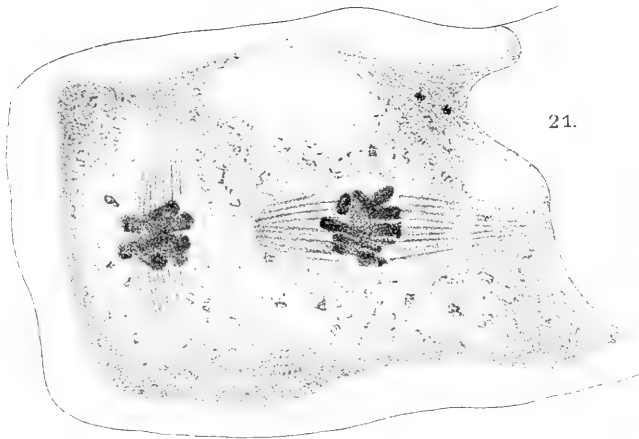
17.



18.



21.

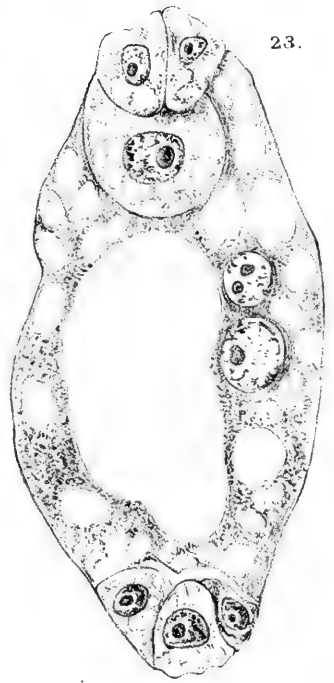
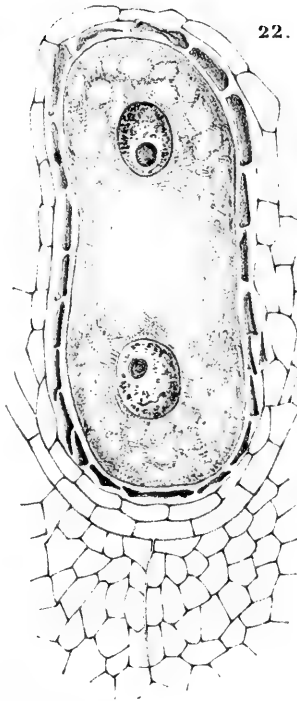
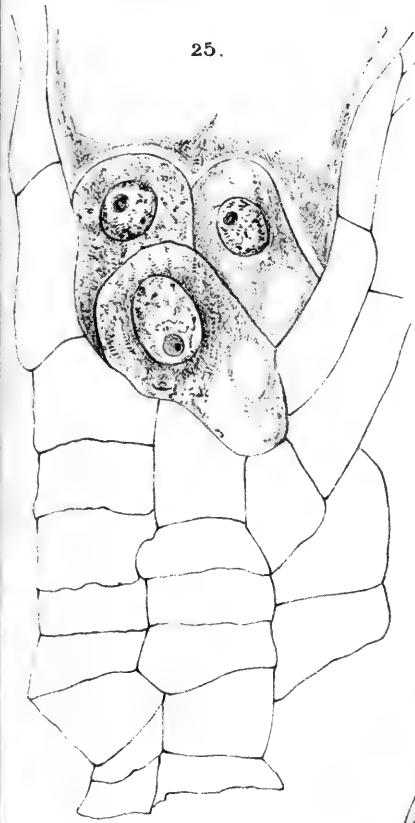


19.

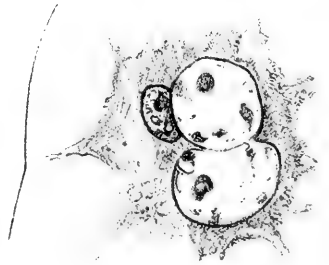


20.





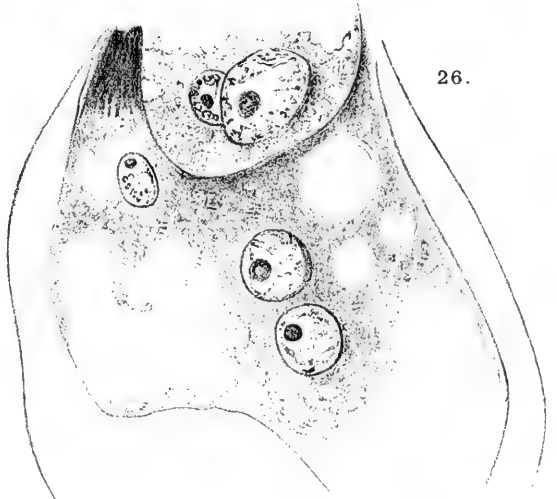
27.

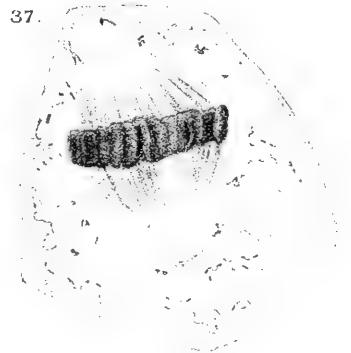
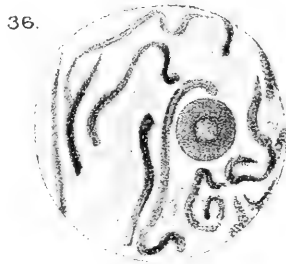
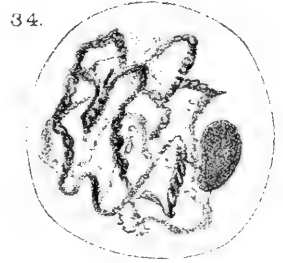
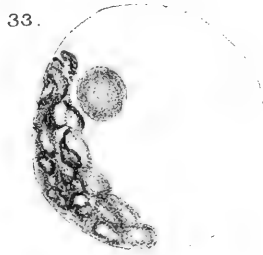
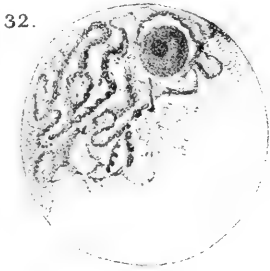
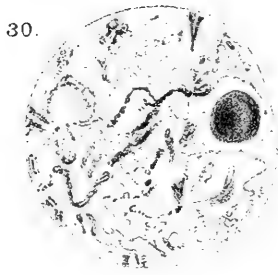


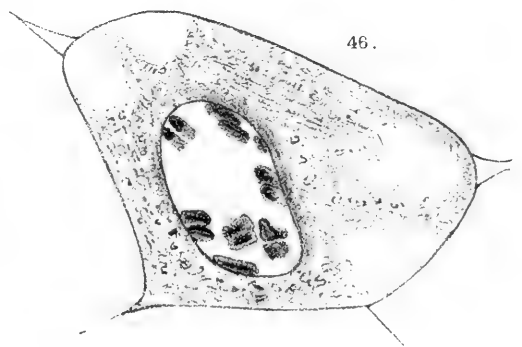
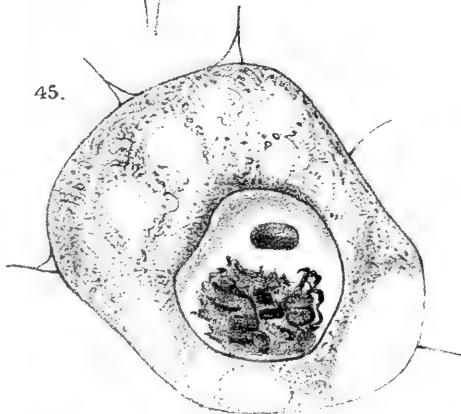
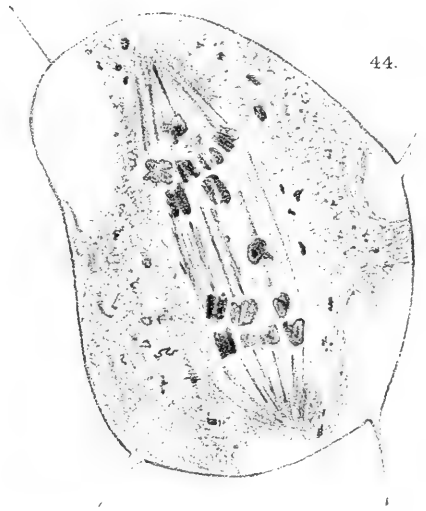
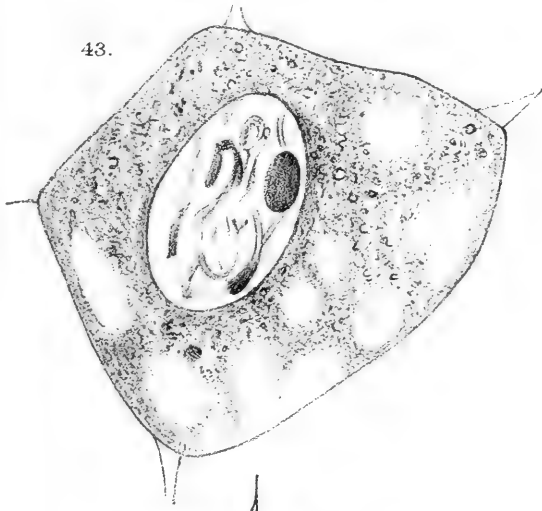
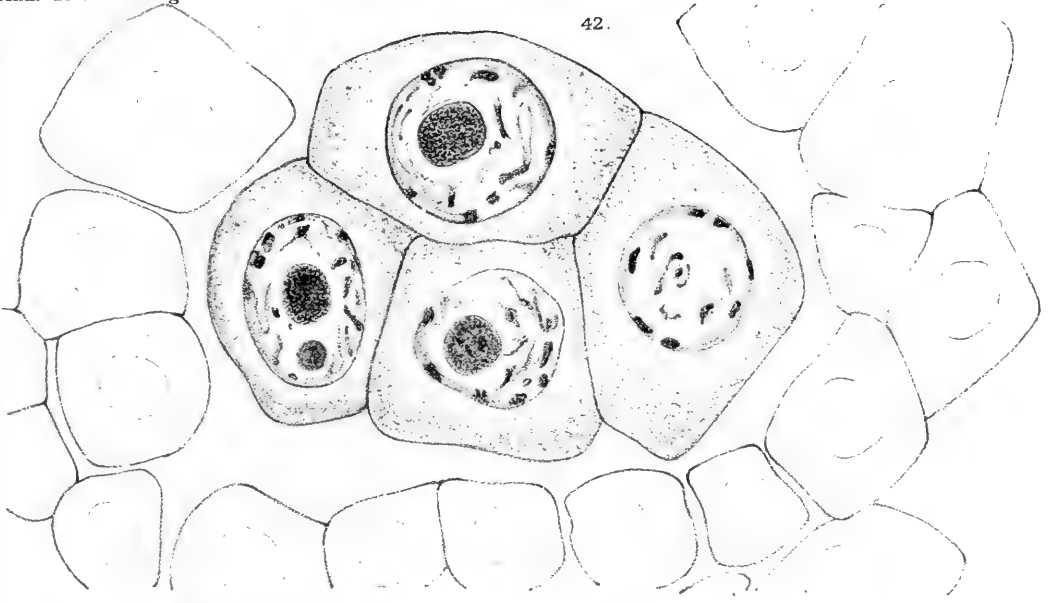
24.



26.



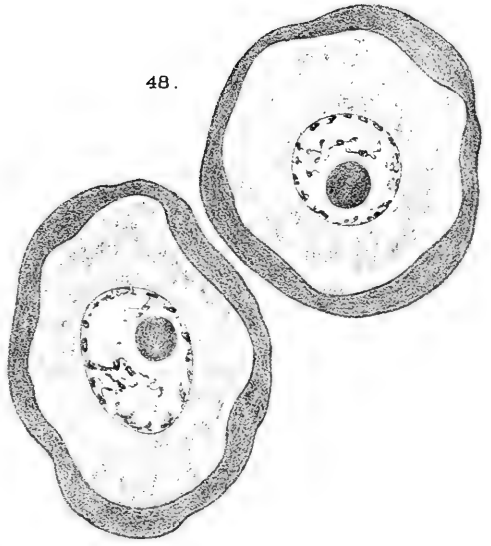




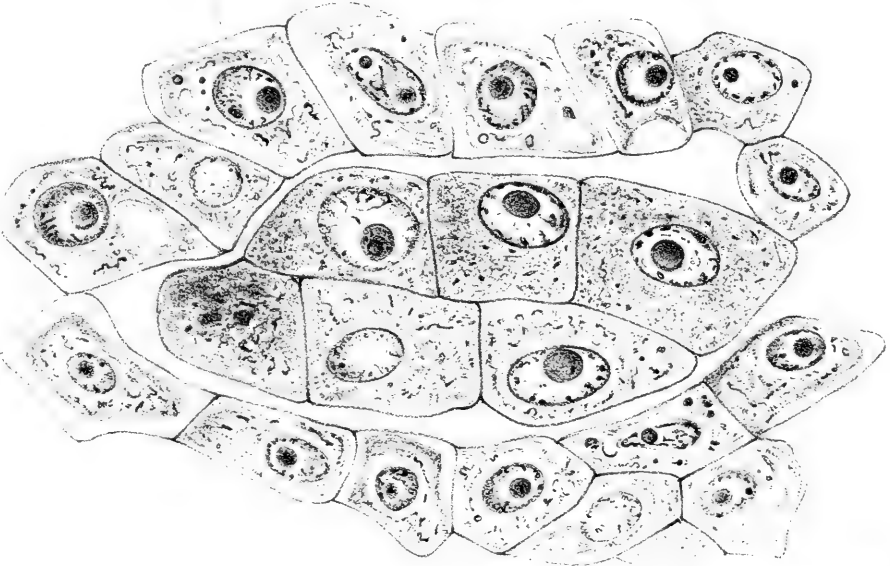
47.



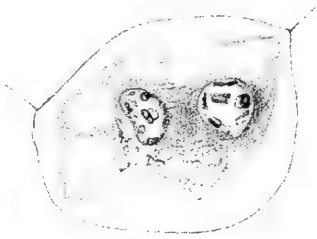
48.



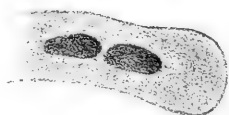
52.



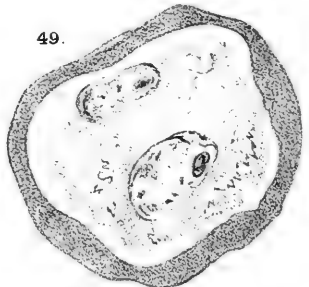
51.



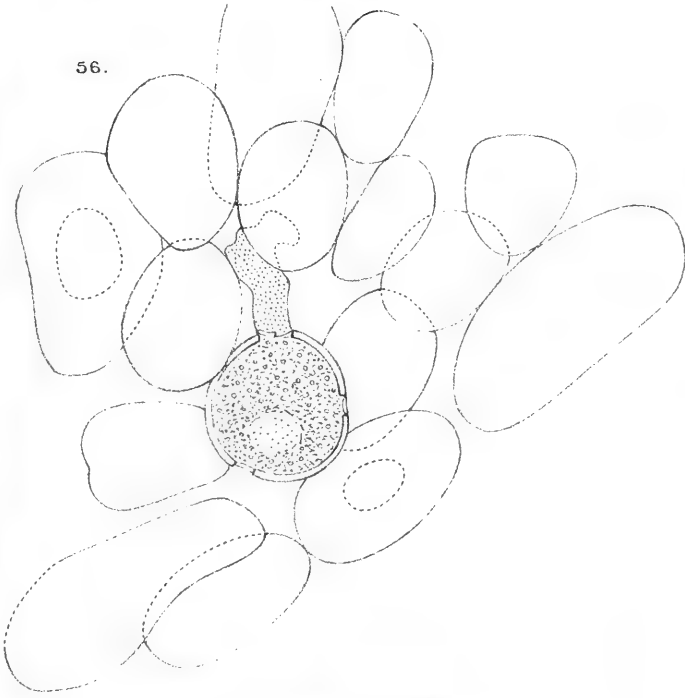
50.



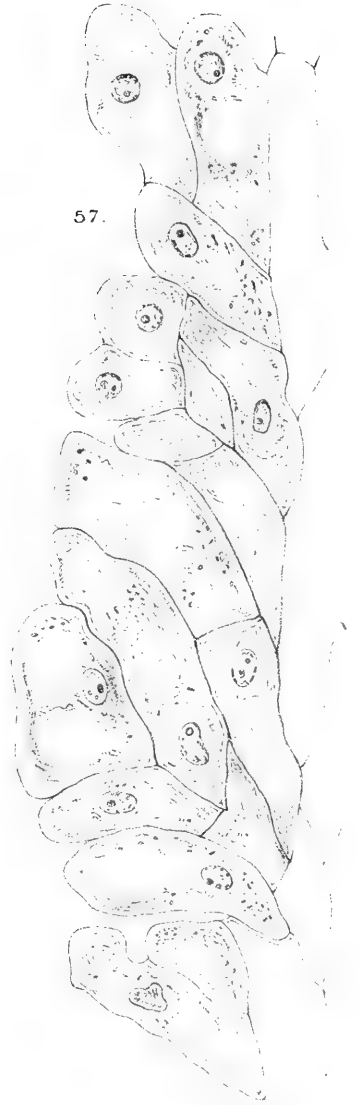
49.



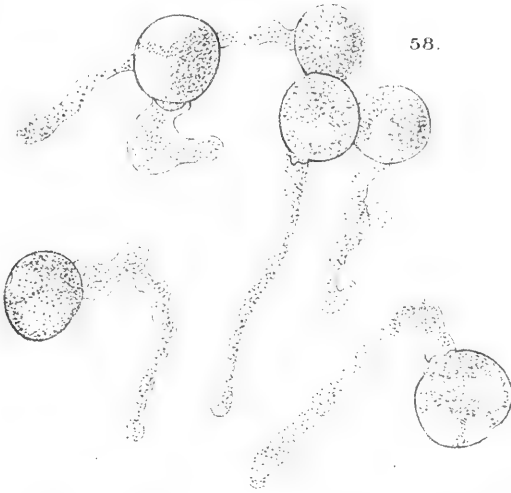
56.



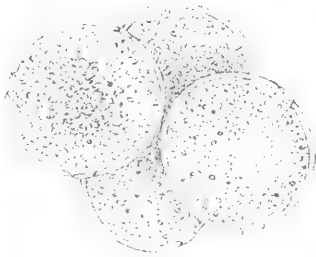
57.



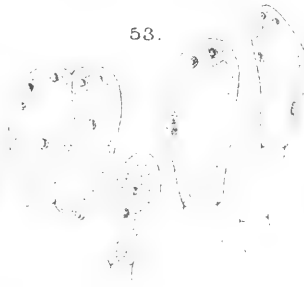
58.



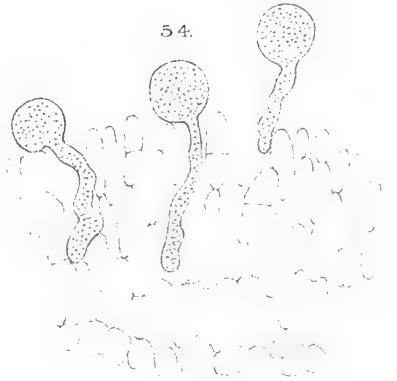
55.



53.



54.





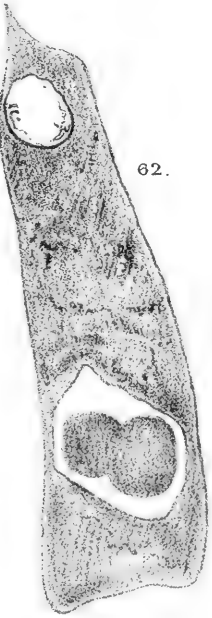
59.



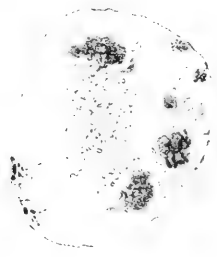
60.



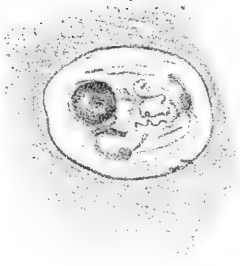
62.



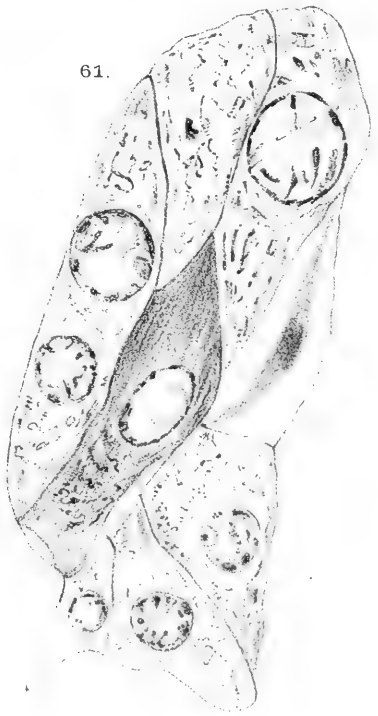
63.



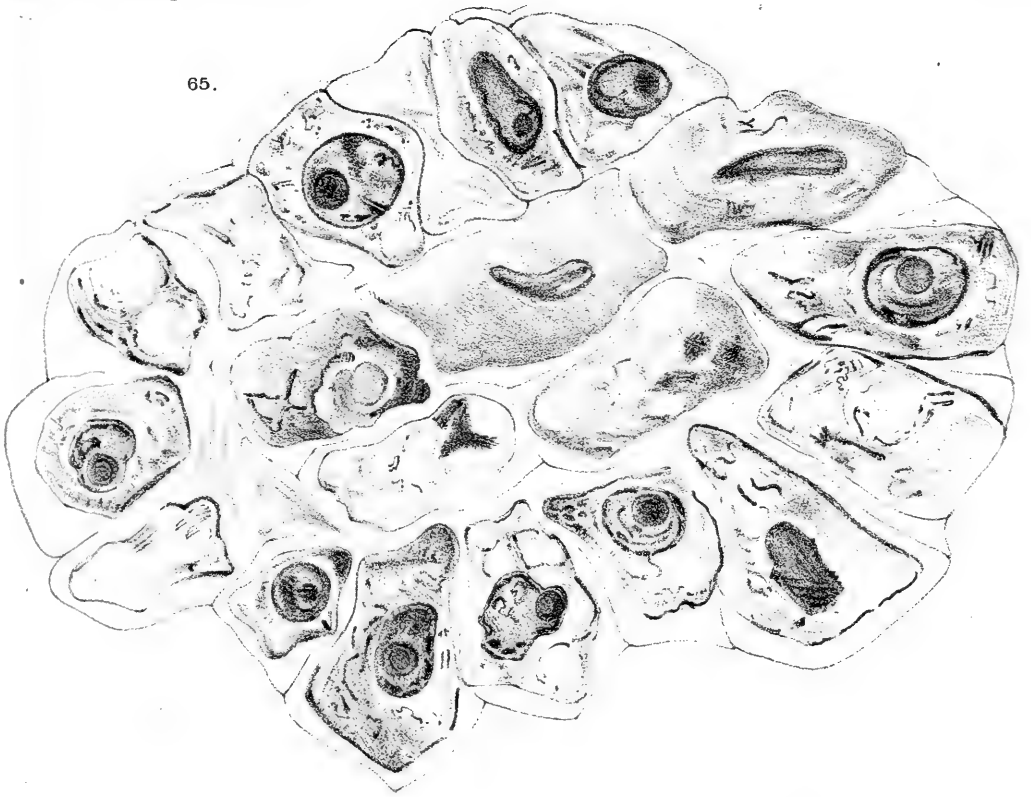
64.



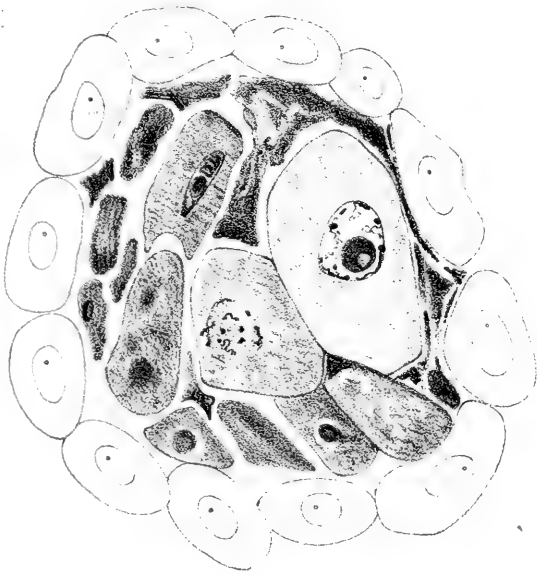
61.



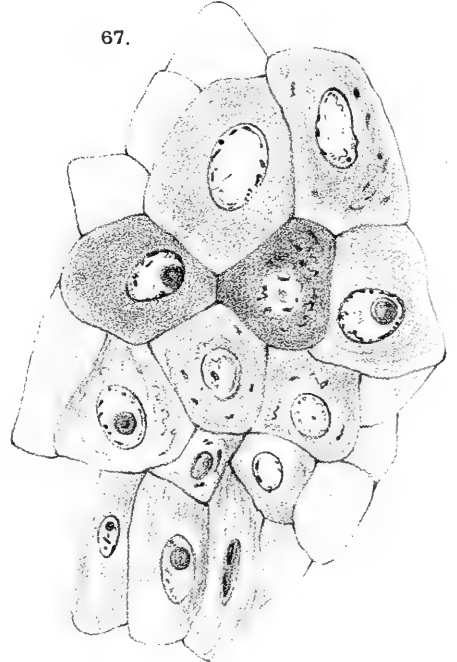
65.

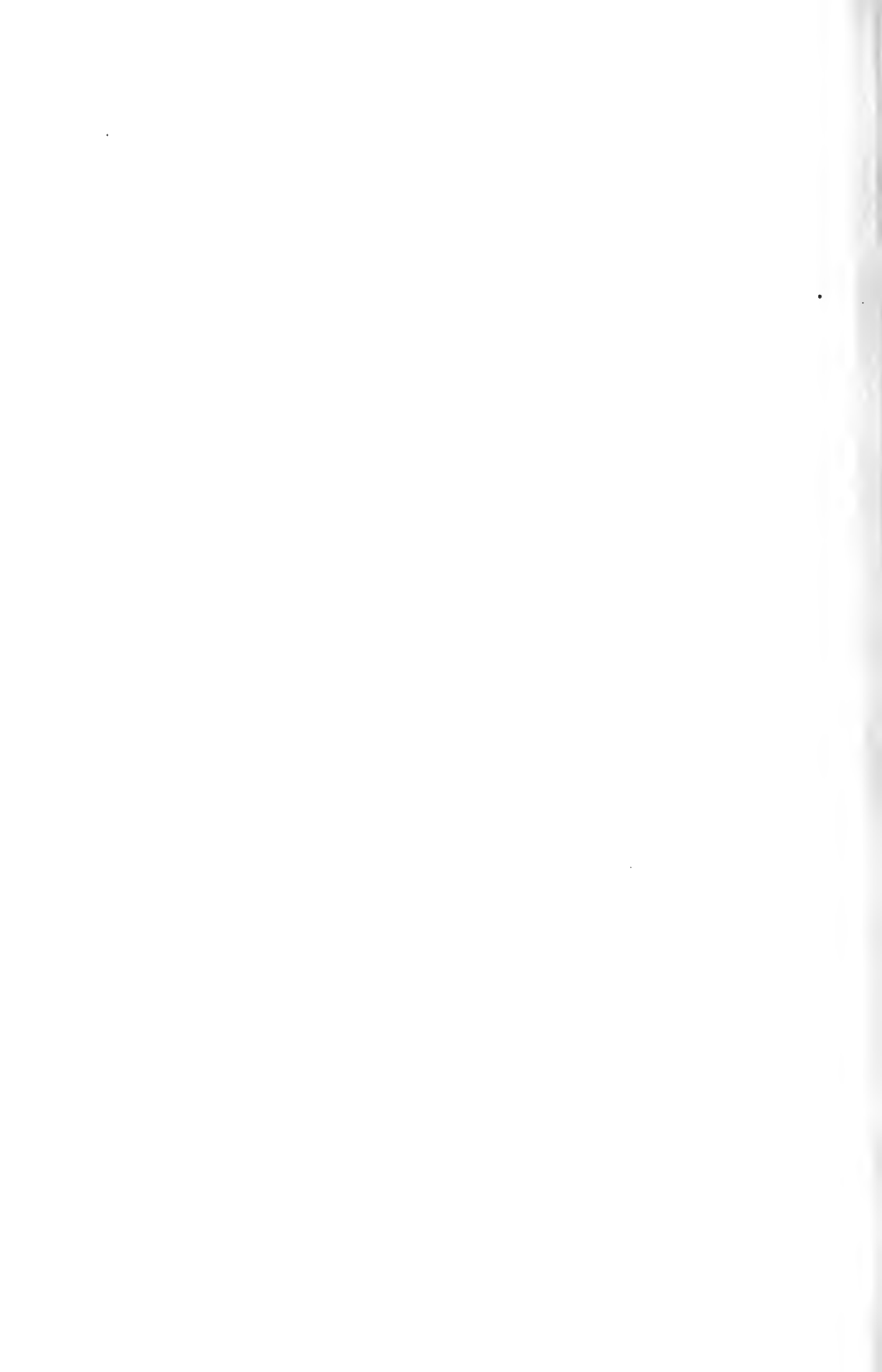


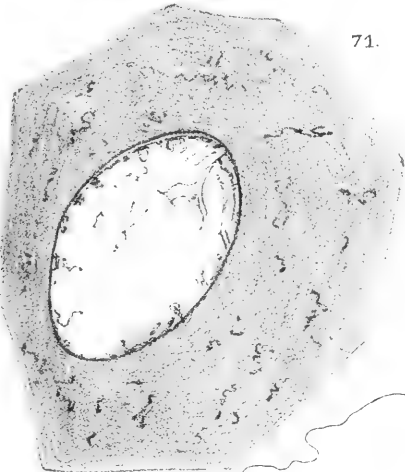
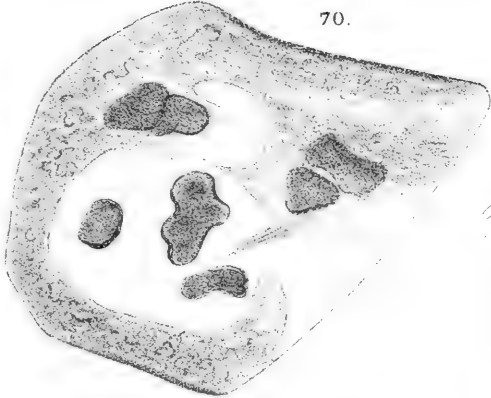
66.

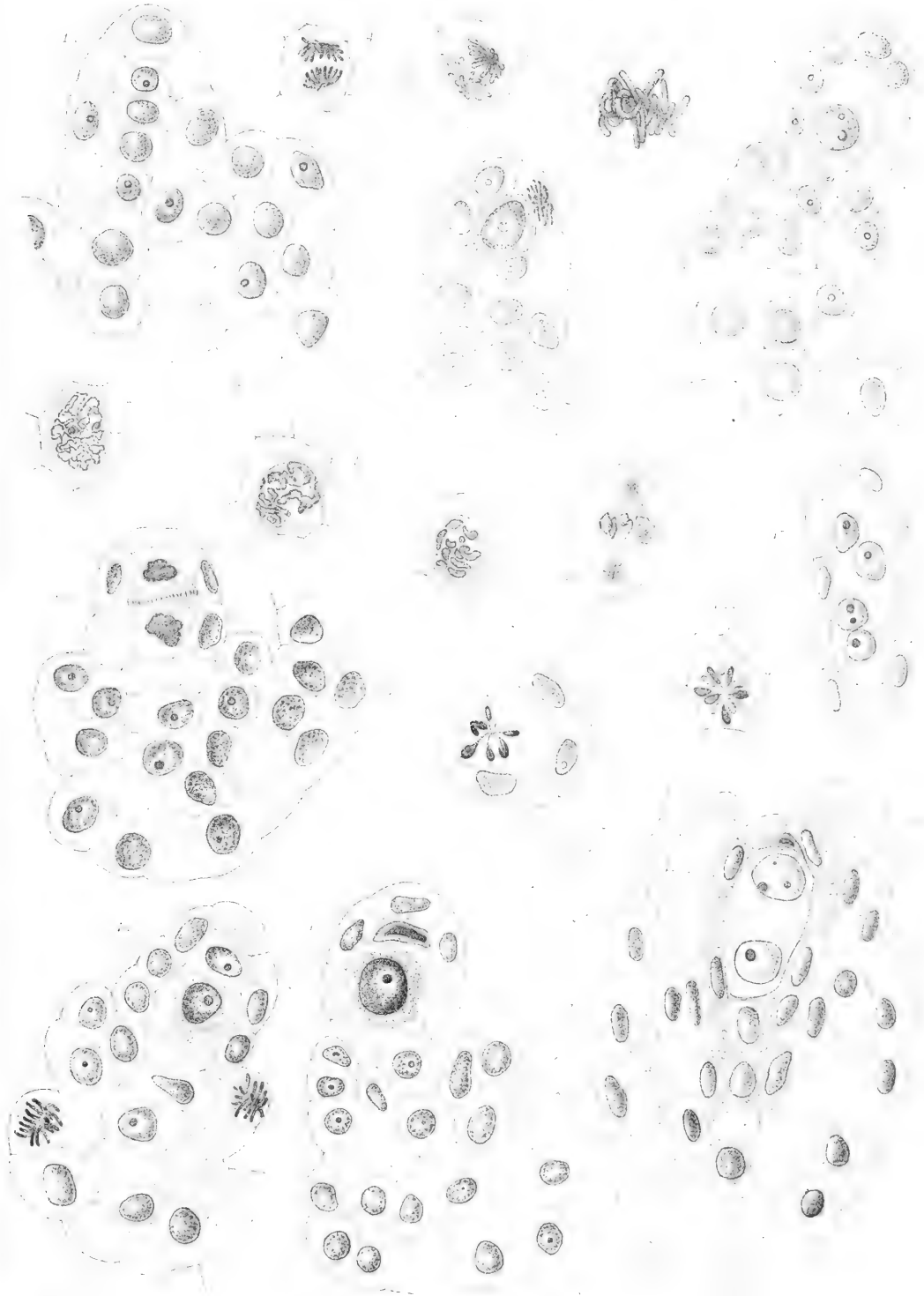


67.





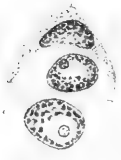
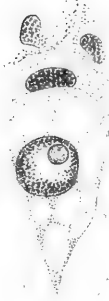
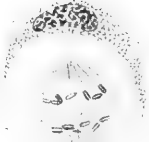
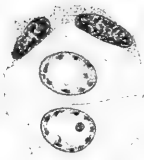
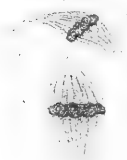
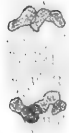
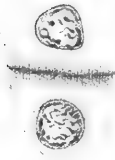
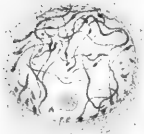












New York Botanical Garden Library



3 5185 00258 6491

